



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **DEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE OXITETRACICLINA EN LECHE A TRAVÉS DE PRE-TRATAMIENTOS Y USO DE LACASAS, PARA MITIGAR LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO Y AGUA**

**JEFFERSON VÍCTOR PAZ LEÓN**

Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, presentado  
ante el Instituto de Posgrado y Educación Continua de la ESPOCH, como requisito  
parcial para la obtención del grado de:

**MAGÍSTER EN INGENIERÍA QUÍMICA APLICADA**

**Riobamba-Ecuador**

Agosto 2020

**©2020, Paz León Jefferson Víctor**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.



## ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

### CERTIFICACIÓN:

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA QUE:

El Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, titulado “DEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE OXITETRACICLINA EN LECHE A TRAVÉS DE PRE-TRATAMIENTOS Y USO DE LACASAS, PARA MITIGAR LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO Y AGUA”, de responsabilidad del Sr. Jefferson Víctor Paz León ha sido prolijamente revisado y se autoriza su presentación.

Tribunal:

Ing. Luis Eduardo Hidalgo Almeida PhD.

**PRESIDENTE**

  
**FIRMA**

Dra. Davinia Sánchez Macías PhD.

**DIRECTOR**

  
**FIRMA**

Bq.F. John Marcos Quispillo Moyota MSc.

**MIEMBRO**


JOHN  
MARCOS  
QUISPILLO  
MOYOTA

Firmado digitalmente por JOHN  
MARCOS QUISPILLO MOYOTA  
DN: cn=JOHN MARCOS QUISPILLO  
MOYOTA, o=SECURITY DATA  
S.A., 1 sup=ENTIDAD DE  
CERTIFICACIÓN DE INFORMACIÓN  
Motivo: Soy el autor de este  
documento  
Ubicación:  
Fecha: 2020-06-06 22:48:05.00

**FIRMA**

Ing. Luis Carlos Hidalgo Viteri MSc.

**MIEMBRO**

  
**FIRMA**

Riobamba, julio 2020

## **DERECHOS INTELECTUALES**

Yo, Jefferson Víctor Paz León, declaro que soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

---

Jefferson Víctor Paz León  
No. Cédula 0603339854

## **DLECARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Jefferson Víctor Paz León, declaro que el presente Trabajo de Titulación modalidad proyectos de investigación y desarrollo, es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales, los textos que constan en el documento y que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este proyecto de investigación de maestría.

Riobamba, julio 2020.

---

Jefferson Víctor Paz León  
No. Cédula 0603339854

## **DEDICATORIA**

Dedicado a Dios, la Virgen María, San José de Cupertino.

El Altísimo me creó  
Su omnipotente Misericordia  
Me la entregó  
Al alma la más sutil concordia  
La dicha a mi corazón.

La felicidad de Dios  
Un pedacito de cielo  
El bálsamo en mi vida  
Raquel Victoria y Víctor Hugo  
Mis padres, mi riqueza, mi poesía, mi bendición.

## **AGRADECIMIENTO**

Gracias Señor de la Misericordia.

Dios les pague mamá, papá, ñañita Raquel, ñaños Byron, Hugo, Carlos.

También a vos Manchas.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	xiii
--------------	------

ABSTRACT .....	xiv
----------------	-----

### CAPÍTULO I

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Planteamiento del problema .....	1
1.1.1 Situación problemática.....	1
1.1.2 Formulación del problema .....	2
1.1.3 Preguntas directrices o específicas de la investigación .....	3
1.1.4 Justificación de la investigación.....	3
1.1.5 Objetivo general de investigación .....	4
1.1.6 Objetivos específicos de investigación.....	4

### CAPÍTULO II

<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
2.1 Antecedentes del problema .....	6
2.2 Bases teóricas .....	7
2.2.1 Residuos de antibióticos detectados en leche.....	7
2.2.2 Pre-tratamientos de la leche .....	8
2.2.3 Uso de lacasas en degradación de contaminantes .....	9

### CAPÍTULO III

<b>3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>10</b>
3.1 Diseño de Investigación .....	10
3.2 Diseño experimental.....	11
3.2.1 Selección de la muestra .....	11
3.2.2 Tamaño de la muestra .....	11
3.3 Cálculo de la concentración de antibiótico para adición en leche.....	11
3.2.3 Tabla de diseño experimental.....	12
3.4 Preparación de la muestra en leche cruda .....	12
3.5 Preparación de la muestra en leche con pretratamiento térmico .....	13
3.6 Fraccionamiento de la leche: desengrasado y acidificación.....	13
3.7 Preparación de la enzima lacasa y adición a la leche o suero .....	14
3.8 Parada de la reacción, extracción y análisis cromatográfico .....	15



3.9 Preparación de la curva de calibración.....	17
3.10 Análisis estadístico.....	18
3.11 Análisis técnico - económico .....	19

## **CAPÍTULO IV**

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
4.1 Determinación del tiempo de retención de la oxitetraciclina .....	27
4.2 Efecto de las concentraciones de lacasa .....	27
4.3 Efecto de los pretratamientos de la leche .....	28
4.4 Relación concentración de lacasa y tiempo de degradación de OTC en leche cruda sin pretratamiento .....	36
4.5 Relación concentración de lacasa y tiempo de degradación de OTC en leche pretratada térmicamente .....	38
4.6 Relación concentración de lacasa y tiempo de degradación de OTC en leche descremada.....	38
4.7 Relación concentración de lacasa y tiempo de degradación de OTC en suero .....	40
4.8 Disminución de la contaminación del suelo y agua por efecto de la lacasa .....	43
4.8.1 Legislación Ambiental .....	44
4.9 Relación pretratamiento y tiempo de degradación de oxitetraciclina a una concentración de lacasa baja, media y alta.....	44
4.10 Porcentaje de permanencia de oxitetraciclina a través del tiempo en leche cruda sin pretratamiento, con pretratamiento térmico, descremación y suero.....	49
4.11 Cinética de degradación y proyección de la degradación de OTC a partir de la séptima hora.....	55

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
--------------------------	-----------

<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>64</b>
-----------------------------	-----------

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-3:</b> Codificación de los tratamientos según diseño experimental, los cuales fueron realizados por triplicado.....	12
<b>Tabla 1-4:</b> Valores medios de concentración de oxitetraciclina ( $\mu\text{M}$ ) en muestras de leche cruda, tratada térmicamente, descremada y desuerada (suero), con presencia de diferentes concentraciones de lacasa durante 6 horas de contacto.....	29
<b>Tabla 2-4:</b> Valores medios de concentración de oxitetraciclina ( $\mu\text{M}$ ) en las diferentes muestras agrupadas en función de cada una de las tres concentraciones de lacasa para evidenciar la efectividad del pretratamiento.....	31
<b>Tabla 3-4:</b> Porcentajes (%) de oxitetraciclina remanente en muestras de leche cruda, tratada térmicamente, descremada y desuerada (suero), con presencia de diferentes concentraciones de lacasa durante 6 horas de contacto.....	32
<b>Tabla 4-4:</b> Estimación de la degradación de OTC en leche después de la sexta hora, empleando una concentración baja, media y alta de lacasa en leche cruda.....	55
<b>Tabla 5-4:</b> Estimación de la degradación de OTC en leche después de la sexta hora, empleando una concentración baja, media y alta de lacasa en leche tratada térmicamente.....	57
<b>Tabla 6-4:</b> Estimación de la degradación de OTC en leche después de la sexta hora, empleando una concentración baja, media y alta de lacasa en leche tratada descremada.....	59
<b>Tabla 7-4:</b> Estimación de la degradación de OTC en leche después de la sexta hora, empleando una concentración baja, media y alta de lacasa en suero.....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-3:</b> Esquema de la preparación de las tres concentraciones de enzima lacasa.....	16
<b>Figura 2-3:</b> Estructura química de la oxitetraciclina y doxiciclina.....	17
<b>Figura 1-4:</b> Muestra enriquecida para detectar el tiempo de retención de la oxitetraciclina.....	27
<b>Figura 2-4:</b> Cromatogramas de la leche descremada con oxitetraciclina durante 6 horas de análisis.....	35
<b>Figura 3-4:</b> Curvas cinéticas, degradación OTC durante las 6 primeras horas de estudio a concentraciones de lacasa baja, alta y media en leche cruda.....	56
<b>Figura 4-4:</b> Curvas cinéticas, degradación de OTC durante las 6 primeras horas de estudio a concentraciones de lacasa baja, alta y media en leche pretratada térmicamente.....	58
<b>Figura 5-4:</b> Curvas cinéticas, degradación de OTC durante las 6 primeras horas de estudio a concentraciones de lacasa baja, alta y media en leche descremada.....	60
<b>Figura 6-4:</b> Curvas cinéticas, degradación de OTC durante las 6 primeras horas de estudio a concentraciones de lacasa baja, alta y media en suero.....	62

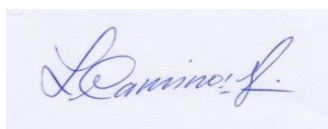
## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-4:</b> Concentración de oxitetraciclina (OTC) en leche cruda a través del tiempo, luego de emplear concentraciones de lacasa baja, media y alta.....	37
<b>Gráfico 2-4:</b> Concentración de oxitetraciclina (OTC) en leche térmizada a través del tiempo, luego de emplear concentraciones de lacasa baja, media y alta.....	39
<b>Gráfico 3-4:</b> Concentración de oxitetraciclina (OTC) en leche descremada a través del tiempo, luego de emplear concentraciones de lacasa baja, media y alta.....	41
<b>Gráfico 4-4:</b> Concentración de oxitetraciclina (OTC) en suero a través del tiempo luego de haber empleado concentraciones de lacasa baja, media y alta.....	42
<b>Gráfico 5-4:</b> Concentración de oxitetraciclina (OTC) a través del tiempo luego de haber empleado pretratamientos a una concentración de lacasa baja.....	45
<b>Gráfico 6-4:</b> Concentración de oxitetraciclina (OTC) a través del tiempo luego de haber empleado pretratamientos a una concentración de lacasa media.....	47
<b>Gráfico 7-4:</b> Concentración de oxitetraciclina (OTC) a través del tiempo luego de haber empleado pretratamientos a una concentración de lacasa alta.....	48
<b>Gráfico 8-4:</b> Porcentaje de oxitetraciclina (OTC) remanente en leche cruda sin pretratamiento, a través del tiempo luego de haber empleado concentraciones de lacasa baja, media y alta.....	50
<b>Gráfico 9-4:</b> Porcentaje de oxitetraciclina (OTC) remanente de leche termizada, a través del tiempo luego de haber empleado concentraciones de lacasa baja, media y alta.....	51
<b>Gráfico 10-4:</b> Porcentaje de oxitetraciclina (OTC) remanente de leche descremada, a través del tiempo luego de haber empleado concentraciones de lacasa baja, media y alta.....	53
<b>Gráfico 11-4:</b> Porcentaje de oxitetraciclina (OTC) remanente de suero, a través del tiempo luego de haber empleado concentraciones de lacasa baja, media y alta.....	54

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar la degradación de residuos de oxitetraciclina en leche usando la enzima lacasa y realizando pretratamientos. Se prepararon muestras de leche con 200  $\mu\text{M}$  de oxitetraciclina, las cuales fueron pretratadas térmicamente, desueradas para obtener el suero, descremadas o sin tratamiento. Éstas a su vez fueron subdivididas en 3 subgrupos, cada uno de los cuales fueron inoculados con 0,1  $\text{mg L}^{-1}$ ; 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  o 0,3  $\text{mg L}^{-1}$  de lacasa. Previo a la inoculación con lacasa, se tomaron muestras control y posteriormente a la adición de la enzima, se tomaron muestras cada hora durante 6 horas. Se realizó una extracción del antibiótico para cuantificar su presencia en las muestras de leche o suero a través de cromatografía líquida de alta resolución. Se realizó una ANOVA de medidas repetidas y las diferencias entre grupos se determinó con el test de Bonferroni. El efecto positivo de la degradación de oxitetraciclina en leche o suero fue gracias a la acción de la lacasa en todas sus concentraciones o por el pretratamiento de desuerado sin adición de lacasa, consiguiéndose una remoción del 75% del antibiótico. Se recomienda utilizar la acidificación para obtener el suero, el cual presenta niveles de oxitetraciclina lo suficientemente bajos como para reutilizarlo, en lugar de desechar al suelo o agua.

**Palabras claves:** INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA, OXITETRACICLINA, LACASA, DEGRADACIÓN DE ANTIBIOTICOS, LECHE.



05-08-2020

0180-DBRAI-UPT-2020

## ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the degradation of oxytetracycline residues in milk using the laccase enzyme and performing pretreatments. Milk samples were prepared with 200  $\mu\text{M}$  of oxytetracycline, which were thermally pretreated, drained to obtain the serum, skimmed or without treatment. These in turn were subdivided into 3 subgroups, each of which were inoculated with 0,1  $\text{mg L}^{-1}$ ; 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  or 0,3  $\text{mg L}^{-1}$  of laccase. Before inoculation with laccase, control samples were taken and after addition of the enzyme, samples were taken every hour for 6 hours. An extraction of the antibiotic was performed to quantify its presence in the milk or serum samples through high performance liquid chromatography. A repeated measures ANOVA was performed and the differences between groups was determined with the Bonferroni test. The positive effect of the degradation of oxytetracycline in milk or serum was due to the action of laccase in all its concentrations or by the pretreatment of drainage without addition of laccase, achieving 75% removal of the antibiotic. It is recommended to use acidification to obtain the serum, which has levels of oxytetracycline low enough to reuse it, instead of discarding it in the soil or water.

**Key words:** CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY, OXYTETRACYCLINE, LACCASE, ANTIBIOTIC DEGRADATION, MILK.

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Planteamiento del problema

##### *1.1.1 Situación problemática*

Existen antibióticos que se emplean como promotores de crecimiento y otros sólo con fines terapéuticos. El ganado vacuno a lo largo de su etapa de crianza es susceptible de infecciones, como por ejemplo la mastitis, en cuyo momento el uso de antibióticos se ve necesario para los pequeños y grandes ganaderos. Sin embargo, un uso incorrecto de los mismos puede conllevar a graves problemas ambientales, de salud, y económicos (Allison, 1985; Alsager et al., 2018; Rama et al., 2017; Schewe y Brock, 2018).

Frente a la presencia de antibióticos en leche, los productores de leche se pueden ver inmersos en sanciones, porque si este alimento es destinado al consumo humano puede producir alergias a nivel de la piel, enfermedades como el asma e incluso reacciones anafilácticas a la penicilina, por citar algunos ejemplos (Allison, 1985; Rama et al., 2017).

La presencia de antibióticos en leche genera además pérdidas económicas, ya que puede interferir en la calidad de productos derivados, como el yogurt, el queso o la mantequilla, en los que se produce destrucción de los cultivos iniciadores o pérdida del sabor. A causa de estos problemas se debe desechar la leche contaminada (Allison, 1985; Rama et al., 2017).

La leche con residuos de antibióticos se elimina sin un previo tratamiento de degradación, por cuanto su propagación ocasiona contaminación del entorno ambiental y puede provocar la aparición de cepas patógenas resistentes que conllevan a la ineficacia de los antibióticos (Alsager et al., 2018; Schewe y Brock, 2018).

Los residuos de antibióticos también pueden matar bacterias benéficas del suelo que ayudan a mantener su fertilidad o a su vez, las plantas que se siembran en suelos contaminados pueden absorber de la tierra estos residuos, lo que según Zimmermann et al. (2012), puede ocasionar en los vegetales impactos fitotóxicos que producen raíces cortas y retardo en la germinación de cultivos; por ejemplo, las tetraciclinas perduran meses en el suelo (Zimmermann et al., 2012).

Frente a esta situación se han realizado estudios, que se describen más adelante en la sección de antecedentes de este trabajo, para degradar antibióticos mediante diferentes técnicas como radiación ultravioleta o a través de procesos de oxidación avanzada, que han arrojado resultados satisfactorios, pero estos métodos resultan costosos y además producen subproductos con más toxicidad de acuerdo con Rodríguez et al. (2016).

Ciertos métodos como la filtración, coagulación, floculación o sedimentación se emplean en la separación de contaminantes del agua, pero para dar un tratamiento más eficaz pueden emplearse técnicas como microfiltración, ósmosis inversa o radiación UV, a pesar de esto los residuos de antibióticos pueden persistir (Batt et al., 2006; Homem y Santos, 2011).

Por lo tanto, no existe un proceso que permita degradar los antibióticos presentes en la leche antes de que sea descartada para que el ganadero o el productor de leche puedan implementarlo, de forma fácil y sin altos costos.

Por otra parte, la distribución de los antibióticos en diferentes componentes de la leche permite que puedan volver a ser utilizados, como en alimentación animal, si la concentración está dentro del Límite Máximo de Residuos (LMR) (Ozdemir et al., 2018).

De acuerdo al Codex Alimentarius (2015), la oxitetraciclina (OTC) tiene un LMR de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  en alimentos de consumo humano. Por otra parte, las enzimas que fabrican los hongos terrestres constituyen una alternativa para la degradación de diferentes químicos, entre estos los antibióticos, y ofrecen ventajas porque al emplear enzimas naturales se minimiza o elimina el uso de agentes químicos que en otros procesos de descontaminación son imprescindibles (Mata et al., 2017).

Los antibióticos y otros medicamentos son moléculas constituidas por carbono y su estructura química es muy similar a las moléculas de lignina. En consecuencia, existen evidencias que estas enzimas ligninolíticas (oxidasas y peroxidasas) pueden degradar antibióticos y otros medicamentos, así como otras moléculas orgánicas contaminantes que incluyen a los plaguicidas organofosforados, en otros, menos nocivos para el ambiente (Mata et al., 2017).

### ***1.1.2 Formulación del problema***

¿Es efectivo el uso de lacasas para degradar los residuos de oxitetraciclina en leche, y es posible mejorar dicha efectividad realizando pre-tratamientos térmicos o fraccionamiento por acidificación o desengrasado de la misma?



### ***1.1.3 Preguntas directrices o específicas de la investigación***

¿A través de ensayos a nivel de laboratorio se podrá observar la efectividad de las lacasas como degradador de oxitetraciclina y el tiempo mínimo de permanencia en leche?

¿Los pre-tratamientos de la leche favorecen la degradación de residuos de oxitetraciclina conjuntamente con el uso de la enzima lacasa?

¿El uso de lacasas, en diferentes concentraciones, afecta a la degradación de residuos de oxitetraciclina en leche?

### ***1.1.4 Justificación de la investigación***

Dentro de las líneas de investigación de la Maestría en Ingeniería Química Aplicada se menciona *Remediación del ambiente (tratamiento de residuos y efluentes)*. El presente proyecto se fundamenta en la necesidad de buscar e implementar un proceso que permita descomponer los residuos de antibióticos presentes en leche antes de que éstos causen impacto ambiental negativo y por ende ponga en riesgo la vida de los seres vivos.

La persistencia de residuos de antibióticos en el medio ambiente son resultado del empleo en terapéutica para tratar infecciones en humanos y animales. Estos residuos que van a encauzarse en ríos, aguas superficiales y subterráneas, provocan contaminación y, aunque se puede decir que el agua puede purificarse en plantas de tratamiento, los antibióticos no son eliminados en su totalidad y es por eso que se han llamado residuos persistentes, de manera que puede afectar incluso a organismos vivos y afectar el ecosistema natural (Ramírez et al., 2014).

La principal preocupación de los contaminantes emergentes, y en particular de los antibióticos, recae en el hecho de que las bacterias generan mecanismos de resistencia y estos medicamentos, si no se degradan antes de que la leche se elimine, pueden tener contacto con las bacterias que se localizan en todo el medio ambiente; así, los antibióticos disponibles para tratar infecciones bacterianas van a resultar ineficaces (Alsager et al., 2018).

Un tratamiento adecuado consiste en la aplicación de enzimas para conseguir la remoción de estos contaminantes, dada su naturaleza biológica y su biodegradabilidad. En el caso de la leche contaminada con residuos de antibióticos, se quiere estudiar la degradación de los mismos mediante pre-tratamientos como el tratamiento térmico, la extracción de caseína y obtención de suero mediante fraccionamiento por acidificación previo desengrasado de la leche que, junto con

la adición de la enzima lacasa, posibiliten al ganadero tratar en forma correcta la leche contaminada, sin que perjudique el medio ambiente.

Al momento de comparar pre-tratamientos en leche, como tratamiento térmico y desengrasado con fraccionamiento por acidificación, frente a leche cruda se investigará si la efectividad de la lacasa mejora, de esta manera se podrá dotar al ganadero de un proceso que impida la propagación de los mencionados contaminantes en el ambiente.

Por lo expuesto, es imprescindible encontrar formas y métodos para descartar de forma ideal los alimentos cuando contienen antibióticos, y en este caso la leche, para prevenir problemas ambientales.

#### ***1.1.5 Objetivo general de investigación***

- Degradar residuos de oxitetraciclina en leche a través de pretratamientos y uso de lacasas para mitigar la contaminación del suelo y agua.

#### ***1.1.6 Objetivos específicos de investigación***

- Evaluar el efecto de la enzima lacasa a concentraciones de 0,1 mg L<sup>-1</sup>; 0,2 mg L<sup>-1</sup> y 0,3 mg L<sup>-1</sup> en la degradación de residuos de oxitetraciclina en leche.
- Determinar si los pretratamientos de la leche favorecen la degradación de residuos de oxitetraciclina conjuntamente con el uso de la enzima lacasa a diferentes concentraciones.
- Establecer la efectividad de la lacasa y el tiempo mínimo de permanencia de residuos de oxitetraciclina en leche.

#### ***1.1.7 Hipótesis***

##### ***1.1.7.1 Hipótesis general***

- La degradación de residuos de oxitetraciclina en leche es efectiva a través de pretratamientos y uso de lacasas.

#### *1.1.7.2 Hipótesis específicas*

- Es posible establecer la efectividad de la lacasa y la cantidad residual de oxitetraciclina en la leche.
- Los pre-tratamientos de la leche favorecen la degradación de residuos de oxitetraciclina conjuntamente con el uso de la enzima lacasa.
- El uso de lacasas, en diferentes concentraciones, pueden degradar residuos de oxitetraciclina en leche.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes del problema

Se han realizado estudios de degradación de medicamentos y sustancias orgánicas presentes en agua residual aplicando un coctel de lacasas fúngicas de *Pycnoporus sanguineus* para remover diclofenaco, beta-naftol, 2,4 diclorofenol, 5,7-diyodo-8-hidroxiquinolina. Rodríguez et al. (2016), consiguieron porcentajes de remoción entre el 50% y 97% en un tiempo de reacción máximo de 8 horas para los tres primeros compuestos y 3,5 horas para el último.

Otros estudios arrojaron mejores porcentajes de remoción, mediante la aplicación de lacasas comerciales puras de *Trametes versicolor*. Mientras tanto, Margot et al. (2013), consiguieron una remoción, en agua residual contaminada con diclofenaco, ácido mefenámico, triclosán y bisfenol A, mayor al 90% con una concentración de enzima igual a  $730 \text{ UL}^{-1}$ , en un tiempo entre 40 minutos y cinco horas. Además, la importancia del tratamiento biológico con enzimas para eliminar contaminantes emergentes como los antibióticos radica en que los subproductos de degradación son menos tóxicos o más susceptibles de biodegradación (Margot et al., 2013).

Para degradar antibióticos en agua como sulfonamidas, tetraciclinas y quinolonas, Ding et al. (2016) emplearon menor cantidad de lacasa pero con la ayuda de mediadores como siringaldehído o hidroxibenzotriazol, y aunque los tiempos de remoción disminuyen a un lapso de 15 minutos a 180 minutos, se valen de métodos adicionales como el uso de suelos adsorbentes. De acuerdo a Becker et al. (2016) el uso de mediadores como siringaldehído conduce a un aumento de la toxicidad a causa de los subproductos formados con el siringaldehído.

La mayor parte de trabajos que utilizaron enzimas para degradar sustancias químicas y en el caso de las lacasas, especializadas en la oxidación de compuestos fenólicos, lo hicieron con extractos fúngicos (Trejo et al., 2000).

Una minoría de investigaciones se realizaron con lacasas purificadas en el que se estudió la degradación de disruptores químicos, nonilfenol y triclosán; eliminándose el 95% a pH 5 en un tiempo de 8 horas a una actividad enzimática de  $100 \text{ U L}^{-1}$  (Ramírez et al., 2014).

Los estudios llevados a cabo hasta el momento para degradar antibióticos en leche se han efectuado con la ayuda de procesos de oxidación avanzada con ozono (Alsager et al., 2018). Mediante ozono se logró remover entre un 70 a 95% de diferentes tipos de antibióticos en un tiempo de 10 minutos de contacto con ozono más 5 días de envejecimiento de la leche, mediante radiación solar, ultravioleta y con fotocatalizadores químicos se pudo remover entre el 44 y 100% de trimetoprima y sulfametoxazol en un tiempo de 20 a 35 minutos (Martínez et al., 2018) o aplicando métodos electroquímicos con los que se degradó un 83% de oxitetraciclina en 6 horas (Kitazono et al., 2012), pero resultan costosos y complicados de implementar por parte del productor de leche.

En otras investigaciones realizadas para eliminar antibióticos en leche se hizo uso de adsorbentes como carbón activado o resinas funcionales, pero los métodos no resultan factibles porque no se consigue una separación total del antibiótico de la leche según lo descrito en la publicación de Alsager et al. (2018). Además, sólo puede removerse cantidades de antibiótico pequeñas entre 0,01 y 0,2 Unidades Internacionales en tiempos que van desde minutos a varias horas, ya que depende del tamaño de partícula del adsorbente y se consigue separar la molécula de antibiótico más no degradarla (Charm, 1980).

En el presente trabajo se valoró la efectividad de la degradación de antibióticos en leche agregando la enzima lacasa de *Trametes versicolor* y para analizar si mejora la degradación se realizaron pretratamientos que son: pretratamiento térmico o extracción de grasa y fraccionamiento por acidificación de la leche descremada para la obtención de suero. Así, se podría brindar la posibilidad, tanto a pequeños como a grandes productores de leche, de aplicar un proceso fácil y barato para dar tratamiento a la leche contaminada con xenobióticos antes de verter al medio ambiente, evitando que se produzca un grave daño al ecosistema.

## **2.2 Bases teóricas**

### ***2.2.1 Residuos de antibióticos detectados en leche***

En el Ecuador, el estudio de Ortiz et al. (2017), detectó que, de 141500 litros de leche cruda, el 64.7% no era apta para el consumo humano, ya sea por la presencia de antibióticos, agentes neutralizantes o peróxido de hidrogeno. En la zona austral de Ecuador se concluye que el 65% de antibióticos que más inciden son los betalactámicos (Ortiz, 2014). Incluso, se ha detectado residuos de antibióticos en ciertas leches comerciales del Ecuador (Díaz, 2008). Los antibióticos más usados en ganadería, según León (2013), son los betalactámicos, aminoglucósidos y tetraciclinas para el control de enfermedades y manifestaciones clínicas como mastitis, retención placentaria, traumatismos y fiebre.

En Kosovo se encontró que la amoxicilina, penicilina G y cloxacilina son los residuos presentes con mayor frecuencia en leche de granjas ganaderas (Rama et al., 2017). En otros estudios se reportan que los antibióticos más comunes y de utilidad en ganadería son amoxicilina, doxiciclina, ciprofloxacina y sulfadiazina (Alsager et al., 2018).

De acuerdo con Vásquez y Olivera (2012), entre los betalactámicos más frecuentes que pueden encontrarse en leche de vaca son mezclas de cloxacilina y ampicilina, penicilinas G y en menor cantidad cefalosporinas, amoxicilina y penetamato. Según Cruz (2009), en el caso de vacas enfermas con metritis puede administrarse cefapirina benzatinica y oxitetraciclina, las mismas que pueden ser excretadas en la leche.

De acuerdo con American Institute Meat (2011), el grupo terapéutico de las tetraciclinas es el antibiótico más utilizado para animales de consumo humano. Por lo tanto, para el presente trabajo de titulación se utilizará la oxitetraciclina como componente experimental, ya que está dentro del grupo farmacológico mencionado.

### ***2.2.2 Pre-tratamientos de la leche***

Este trabajo se llevó a cabo con el objeto de que el ganadero pueda emplear un proceso sencillo para degradar residuos de antibióticos en leche, sin que se requiera de un equipamiento costoso, o materiales que tornen complejo el tratamiento. Por ello que se quiso investigar los pretratamientos factibles de llevar a cabo como son tratamiento térmico, desengrasado y fraccionamiento por acidificación con fines de extraer el suero, para indagar si el comportamiento de las lacasas mejora o no, en comparación a la actividad de la lacasa en leche cruda.

Los pretratamientos que se usaron en el presente trabajo se detallan a continuación.

#### ***2.2.2.1 Tratamiento térmico***

Según Rosado y Rosado (2013), un tratamiento térmico se aplica a la leche con fines de reducir riesgos en la salud humana a causa de organismos patógenos asociados al alimento, evitando que se produzcan alteraciones físicas, químicas y organolépticas del producto. Sin embargo, el incremento de temperatura se puede aprovechar con fines degradativos de residuos de antibióticos. De acuerdo con Ortíz (2014), se sabe que la penicilina, por ejemplo, sufre degradación hasta un 20% a 90°C durante 30 minutos.

#### 2.2.2.2 Desengrasado y fraccionamiento por acidificación

Según Alsager et al. (2018), los antibióticos disponibles en forma libre poseen cierta preferencia por dirigirse a la caseína, porque las moléculas pequeñas similares a los antibióticos como la lactosa y las vitaminas no están libremente disponibles en solución. A pesar de esto, no es un dato concluyente puesto que de acuerdo con Gómez (2017), los antibióticos como la oxitetraciclina son compuestos hidrosolubles y pueden permanecer en el suero al momento de realizar un fraccionamiento de la leche. Es necesario estudiar el comportamiento de la lacasa y de los antibióticos en las fracciones de leche.

Con el objetivo de realizar un fraccionamiento ácido de la leche, en primer lugar, se realizó un pretratamiento de desengrasado mediante centrifugación y descremado. El suero de la leche es un líquido translúcido verde que se obtuvo de la leche descremada después de la precipitación de la caseína. El suero se obtuvo por adición de ácidos clorhídrico, con lo que disminuyó el pH de la leche hasta 4,6 y posteriormente se centrifugó.

#### 2.2.3 Uso de lacasas en degradación de contaminantes

Investigaciones de Ahumada (2016), con enzimas de hongos de *Penicillium commune*, *Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Epicoccum nigrum* y *Emericellopsis alkalina* demostraron una remoción de oxitetraciclina en agua igual al 73% en 18 días. Las enzimas de los hongos *Trichoderma deliquescens*, *Trichoderma harzianum*, *Taralomyces atroroseus* y *Penicilium crustosum* degradaron 93% oxitetraciclina en agua en 21 días. Entre las enzimas de hongos para producir degradación de antibióticos destacan las ligninasas con propiedades oxidativas como las oxidasas y las peroxidasas (Ergun y Raziye, 2017; Mata et al., 2017). Una clase de oxidasas representan las lacasas, que pueden degradar lignina, necesitan además otras fuentes de carbono para realizar esta función; estas fuentes son la glucosa o la celulosa (Mata et al., 2017).

El mecanismo de las lacasas para provocar oxidación consiste en oxidar un núcleo fenólico, mediante el retiro de un electrón, de modo que se forma un radical fenoxilo que escinde la lignina en sus monómeros constituyentes. Sin embargo, las lacasas pueden también actuar en compuestos no fenólicos (Mata et al., 2017).

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

#### 3.1 Diseño de Investigación

Se aplicó un diseño de investigación experimental ya que se busca establecer el posible efecto de degradación del antibiótico (variable dependiente) de una causa (variable independiente) que se manipula, como es la variación de los niveles de lacasa ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  y  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) y de los pre-tratamientos que incluyen tratamiento térmico a  $90^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos y fraccionamiento por desnaturalización en medio ácido.

El método inductivo del presente estudio se refiere a la comprobación de la hipótesis de demostrar la efectividad de la lacasa y de los pre-tratamientos mediante la experimentación y de esta manera con los datos que arrojaron la investigación se generó nuevo conocimiento. Al tratarse de un método analítico, se investigó el efecto de la concentración de lacasa, distintos pre-tratamientos de la leche como la pasteurización y el fraccionamiento por acidificación y el tipo de antibiótico utilizado sobre la velocidad de degradación del antibiótico y el tiempo mínimo de permanencia. Finalmente, se realizó un método comparativo porque se estableció el proceso más adecuado al contrastar los resultados que se obtuvieron con la lacasa en leche cruda, tratada térmicamente y en sus fracciones de caseína, suero y grasa, así como entre las concentraciones de lacasa.

El estudio presenta un enfoque cuantitativo porque se utilizó instrumentos que arrojaron como resultados una cantidad, como la concentración de antibiótico residual o el tiempo mínimo de permanencia, los mismos que al final fueron tratados estadísticamente. Estos datos podrán ser replicados.

Además, la investigación presenta un alcance descriptivo y explicativo. Descriptivo porque busca especificar propiedades, características y tendencias importantes de la degradación de los antibióticos. Explicativo porque pretende indicar las causas que favorecieron la degradación de los antibióticos y en qué condiciones se manifestó una mayor o menor efectividad o por qué se relacionaron dos o más pre-tratamientos.

A continuación, se detallan las fases experimentales que se realizaron para obtener los resultados, que nos permitieron llegar a las conclusiones de la investigación:



## 3.2 Diseño experimental

### 3.2.1 Selección de la muestra

Se tomó leche libre de antibióticos como materia prima, en la que se simuló la presencia de oxitetraciclina con una concentración de 200  $\mu\text{M}$  según lo descrito por Alsager et al. (2018), y se seleccionó la cantidad de enzima lacasa, según lo reportado en la literatura científica y las Unidades Internacionales de la actividad asociada a la lacasa comercial.

### 3.2.2 Tamaño de la muestra

Se partió de 8 L de leche, a la cual se añadió el antibiótico a una concentración de 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Esta leche con antibióticos se subdividió en 3 porciones: una quedó como leche cruda con antibiótico, otra que fue tratada térmicamente a 90°C por 20 minutos y la última se fraccionó en leche descremada y suero a través del descremado y acidificación.

Cada uno de estos subgrupos se subdividieron en 3 porciones, las cuales recibieron el tratamiento con lacasa a concentraciones de 0,1  $\text{mg L}^{-1}$ ; 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  o 0,3  $\text{mg L}^{-1}$ . Durante el tiempo experimental el estudio fue realizado por triplicado y se tomaron muestras cada 60 minutos durante 6 horas por triplicado.

Por lo tanto, el tamaño de la muestra fue 4 muestras (leche sin pre-tratamiento, pre-tratamiento térmico, leche descremada y suero) x 1 antibiótico (oxitetraciclina) x 3 concentraciones de lacasas (0,1  $\text{mg L}^{-1}$ ; 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  y 0,3  $\text{mg L}^{-1}$ ) x 6 horas x 3 repeticiones = 252 muestras.

## 3.3 Cálculo de la concentración de antibiótico para adición en leche

Para la obtención de 250 mL (0,25 L) de leche con una concentración de 200  $\mu\text{M}$  de OTC se añadió una cantidad de antibiótico puro de acuerdo al siguiente cálculo:

$$200 * 10^{-6} \frac{\text{mol OTC}}{\text{L}} * \frac{460,434 \text{ g OTC}}{1 \text{ mol OTC}} * \frac{100 \text{ g OTC}}{98 \text{ g OTC}} * 0,25 \text{ L} = 0,0235 \text{ g OTC}$$

### 3.2.3 Tabla de diseño experimental

**Tabla 1-3:** Codificación de los tratamientos según diseño experimental, los cuales fueron realizados por triplicado.

Muestra Código <sup>a</sup>	Tiempo cero $t_0$	Trata- miento C <sup>b</sup>	Tiempo (horas)					
	$t_0$	C <sup>b</sup>	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$t_5$	$t_6$
N	[L <sub>1</sub> ]N $t_0$	[L <sub>1</sub> ]	[L <sub>1</sub> ]N $t_1$	[L <sub>1</sub> ]N $t_2$	[L <sub>1</sub> ]N $t_3$	[L <sub>1</sub> ]N $t_4$	[L <sub>1</sub> ]N $t_5$	[L <sub>1</sub> ]N $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>2</sub> ]N $t_0$	[L <sub>2</sub> ]	[L <sub>2</sub> ]N $t_1$	[L <sub>2</sub> ]N $t_2$	[L <sub>2</sub> ]N $t_3$	[L <sub>2</sub> ]N $t_4$	[L <sub>2</sub> ]N $t_5$	[L <sub>2</sub> ]N $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>3</sub> ]N $t_0$	[L <sub>3</sub> ]	[L <sub>3</sub> ]N $t_1$	[L <sub>3</sub> ]N $t_2$	[L <sub>3</sub> ]N $t_3$	[L <sub>3</sub> ]N $t_4$	[L <sub>3</sub> ]N $t_5$	[L <sub>3</sub> ]N $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>1</sub> ]T $t_0$	[L <sub>1</sub> ]	[L <sub>1</sub> ]T $t_1$	[L <sub>1</sub> ]T $t_2$	[L <sub>1</sub> ]T $t_3$	[L <sub>1</sub> ]T $t_4$	[L <sub>1</sub> ]T $t_5$	[L <sub>1</sub> ]T $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>2</sub> ]T $t_0$	[L <sub>2</sub> ]	[L <sub>2</sub> ]T $t_1$	[L <sub>2</sub> ]T $t_2$	[L <sub>2</sub> ]T $t_3$	[L <sub>2</sub> ]T $t_4$	[L <sub>2</sub> ]T $t_5$	[L <sub>2</sub> ]T $t_6$
T	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>3</sub> ]T $t_0$	[L <sub>3</sub> ]	[L <sub>3</sub> ]T $t_1$	[L <sub>3</sub> ]T $t_2$	[L <sub>3</sub> ]T $t_3$	[L <sub>3</sub> ]T $t_4$	[L <sub>3</sub> ]T $t_5$	[L <sub>3</sub> ]T $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>1</sub> ]D $t_0$	[L <sub>1</sub> ]	[L <sub>1</sub> ]D $t_1$	[L <sub>1</sub> ]D $t_2$	[L <sub>1</sub> ]D $t_3$	[L <sub>1</sub> ]D $t_4$	[L <sub>1</sub> ]D $t_5$	[L <sub>1</sub> ]D $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>2</sub> ]D $t_0$	[L <sub>2</sub> ]	[L <sub>2</sub> ]D $t_1$	[L <sub>2</sub> ]D $t_2$	[L <sub>2</sub> ]D $t_3$	[L <sub>2</sub> ]D $t_4$	[L <sub>2</sub> ]D $t_5$	[L <sub>2</sub> ]D $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>3</sub> ]D $t_0$	[L <sub>3</sub> ]	[L <sub>3</sub> ]D $t_1$	[L <sub>3</sub> ]D $t_2$	[L <sub>3</sub> ]D $t_3$	[L <sub>3</sub> ]D $t_4$	[L <sub>3</sub> ]D $t_5$	[L <sub>3</sub> ]D $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
D	[L <sub>1</sub> ]S $t_0$	[L <sub>1</sub> ]	[L <sub>1</sub> ]S $t_1$	[L <sub>1</sub> ]S $t_2$	[L <sub>1</sub> ]S $t_3$	[L <sub>1</sub> ]S $t_4$	[L <sub>1</sub> ]S $t_5$	[L <sub>1</sub> ]S $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>2</sub> ]S	[L <sub>2</sub> ]	[L <sub>2</sub> ]S $t_1$	[L <sub>2</sub> ]S $t_2$	[L <sub>2</sub> ]S $t_3$	[L <sub>2</sub> ]S $t_4$	[L <sub>2</sub> ]S $t_5$	[L <sub>2</sub> ]S $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>3</sub> ]S	[L <sub>3</sub> ]	[L <sub>3</sub> ]S $t_1$	[L <sub>3</sub> ]S $t_2$	[L <sub>3</sub> ]S $t_3$	[L <sub>3</sub> ]S $t_4$	[L <sub>3</sub> ]S $t_5$	[L <sub>3</sub> ]S $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>1</sub> ]S $t_0$	[L <sub>1</sub> ]	[L <sub>1</sub> ]S $t_1$	[L <sub>1</sub> ]S $t_2$	[L <sub>1</sub> ]S $t_3$	[L <sub>1</sub> ]S $t_4$	[L <sub>1</sub> ]S $t_5$	[L <sub>1</sub> ]S $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>2</sub> ]S	[L <sub>2</sub> ]	[L <sub>2</sub> ]S $t_1$	[L <sub>2</sub> ]S $t_2$	[L <sub>2</sub> ]S $t_3$	[L <sub>2</sub> ]S $t_4$	[L <sub>2</sub> ]S $t_5$	[L <sub>2</sub> ]S $t_6$
S	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas
	[L <sub>3</sub> ]S	[L <sub>3</sub> ]	[L <sub>3</sub> ]S $t_1$	[L <sub>3</sub> ]S $t_2$	[L <sub>3</sub> ]S $t_3$	[L <sub>3</sub> ]S $t_4$	[L <sub>3</sub> ]S $t_5$	[L <sub>3</sub> ]S $t_6$
	3 replicas		3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas	3 replicas

<sup>a</sup> Muestras de Leche con Oxitetraciclina (N=cruda, T=tratada térmicamente, D=descremada, S=suero)

<sup>b</sup> Diferentes concentraciones de lacasa ([L<sub>1</sub>]=0,1 mg L<sup>-1</sup>, [L<sub>2</sub>]=0,2 mg L<sup>-1</sup>, [L<sub>3</sub>]=0,3 mg L<sup>-1</sup>)

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

### 3.4 Preparación de la muestra en leche cruda

Se preparó las muestras de leche con oxitetraciclina, de la siguiente manera:

- Se pesó 0,0235 g de OTC para diluir con una varilla de vidrio en un vaso de precipitación de 50 mL, con una pequeña cantidad de leche. Después, se agregó la leche con la OTC disuelta en un balón de aforo de 250 mL.

- El vaso en el que se disolvió la OTC, se enjuagó con leche y se depositó en el balón de aforo hasta completar los 250 mL. A cada una de las muestras de 250 ml de leche cruda con oxitetraciclina se agregó la enzima lacasa en una concentración de 0,1 mg L<sup>-1</sup>; 0,2 mg L<sup>-1</sup>; 0,3 mg L<sup>-1</sup>.

### **3.5 Preparación de la muestra en leche con pretratamiento térmico**

- Se pesó 0,0235 g de OTC para diluir con una varilla de vidrio en un vaso de precipitación de 50 mL, con una pequeña cantidad de leche. Después, se agregó la leche con la OTC disuelta en un balón de aforo de 250 mL.
- El vaso en el que se disolvió la OTC, se enjuagó con leche se depositó en el balón de aforo hasta completar los 250 mL. Las muestras preparadas, se calentaron a 90°C por 20 minutos sin que alcancen el punto de ebullición y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. A las muestras sometidas a pretratamiento térmico se agregó la enzima lacasa en una concentración de 0,1 mg L<sup>-1</sup>; 0,2 mg L<sup>-1</sup>; 0,3 mg L<sup>-1</sup>.

### **3.6 Fraccionamiento de la leche: desengrasado y acidificación**

- Siguiendo la metodología descrita según Ozdemir et al. (2018) para amoxicilina y realizando modificaciones menores de la técnica, se adicionó 50 ml de leche entera en un tubo falcon de 50 mL y se centrifugó a 4000 x g durante 45 minutos a 24°C y se retiró la crema.
- La leche descremada se usó para fraccionamiento de suero y otra parte permaneció como tal para realización de los análisis.
- Para separar las caseínas del suero, en el matraz con leche descremada se adicionó HCl 37,7% hasta llegar a pH 4,6.
- Se realizó la centrifugación a 3000 x g durante 30 minutos a 24°C, con menores modificaciones de la metodología descrita por Ziv y Rasmussen (1975), para la obtención de caseína y suero. Posterior a esto, el suero se llevó a pH de 6,7 mediante la adición de una solución de NaOH 37,7% con el propósito de trabajar al mismo pH de la leche.
- Las fracciones de leche descremada y suero de 250 mL se agruparon de forma adecuada para que unas muestras reciban una concentración de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de lacasa y otras muestras 0,2 mg L<sup>-1</sup> y 0,3 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.7 Preparación de la enzima lacasa y adición a la leche o suero

Para preparar una solución madre de lacasa a una concentración de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  se procedió de la siguiente manera:

- Se pesó 0,010 g (10 mg) de enzima lacasa, se disolvió y aforó en 100 mL (0,1 L) de agua destilada para obtener una solución de concentración enzimática  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .
- Una vez preparadas las muestras de leche y la solución madre de lacasa, previo a añadir la enzima, se tomaron muestras que serán consideradas control al tiempo 0 ( $t_0$ ). Seguidamente, se añadió la lacasa a cada muestra de leche (cruda, tratada térmicamente, descremada) o suero, tal como se explica a continuación:
- Para preparar la muestra con  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de lacasa se tomó una alícuota de 250  $\mu\text{L}$  (0,00025 L) de la solución de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de lacasa en agua y se adicionó al balón de 250 mL que contiene la leche o suero con el antibiótico, de esta manera se obtuvo 250 mL de leche con  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de enzima lacasa, que a partir de ahora tendrá la codificación de  $L_1$ . El cálculo se muestra a continuación:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$100 \text{ mg L}^{-1} * 0,00025 \text{ L} = 0,1 \text{ mg L}^{-1} * V_2$$

$$V_2 = 0,25 \text{ L (250 mL)}$$

- Para preparar la muestra con  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de lacasa se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  (0,0005 L) de la solución de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de lacasa en agua y se adicionó al balón de 250 mL que contiene la leche o suero con el antibiótico, de esta manera se obtuvo 250 mL de la solución  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de enzima lacasa, que a partir de ahora tendrá la codificación de  $L_2$ . El cálculo se muestra así:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$100 \text{ mg L}^{-1} * 0,0005 \text{ L} = 0,2 \text{ mg L}^{-1} * V_2$$

$$V_2 = 0,25 \text{ L (250 mL)}$$

- Finalmente, para preparar la muestra con  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de lacasa se tomó una alícuota de  $750 \mu\text{L}$  ( $0,00075 \text{ L}$ ) de la solución de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de lacasa en agua y se adicionó al balón de  $250 \text{ mL}$  que contiene la leche o suero con el antibiótico, de esta manera se obtuvo  $250 \text{ mL}$  de la solución  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de enzima lacasa, que a partir de ahora tendrá la codificación de  $L_3$ . El cálculo se muestra a continuación:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$100 \text{ mg L}^{-1} * 0,00075 \text{ L} = 0,3 \text{ mg L}^{-1} * V_2$$

$$V_2 = 0,25 \text{ L (250 mL)}$$

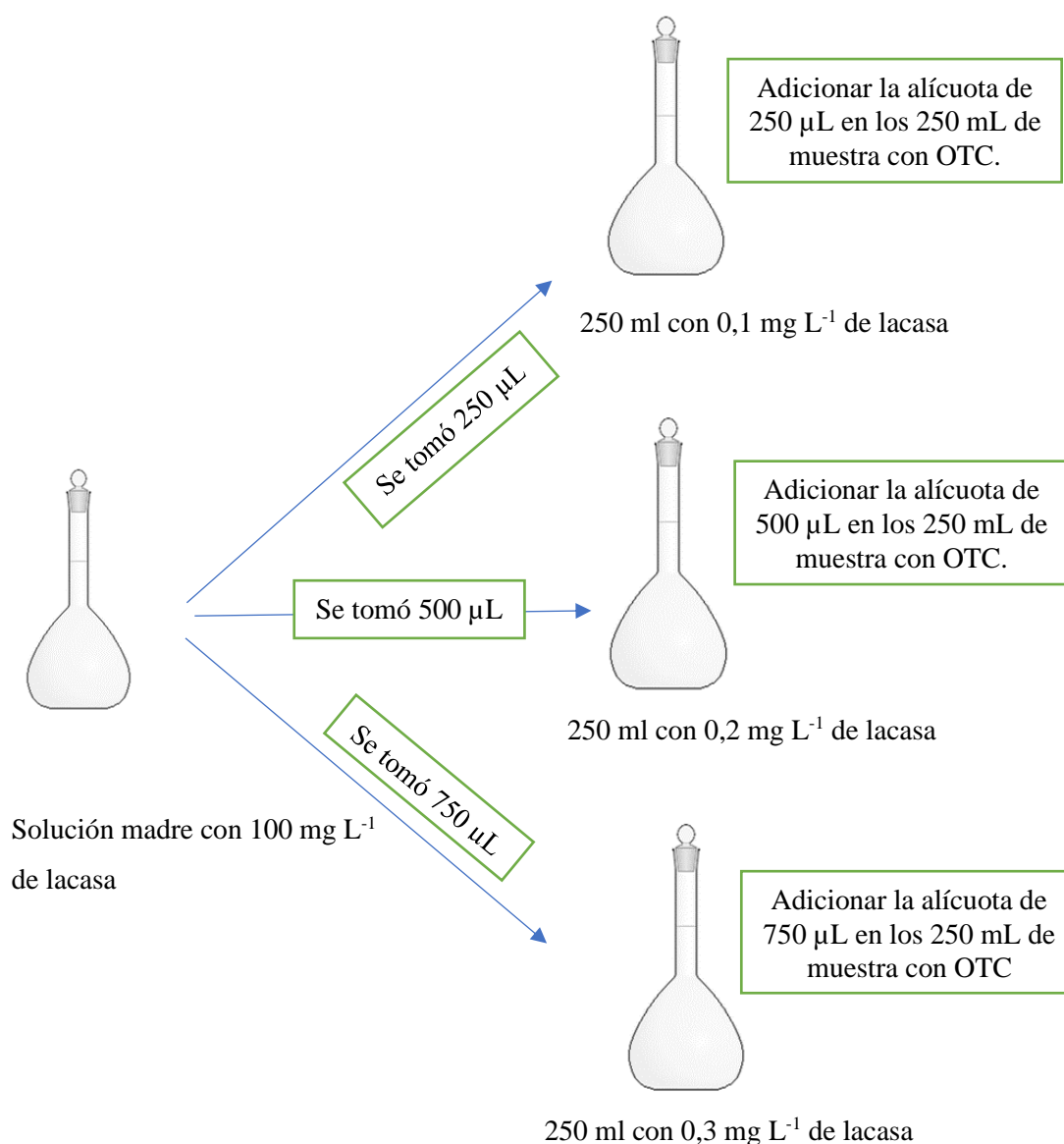
En la Figura 1-3 puede apreciarse en forma gráfica la preparación de las soluciones.

De cada preparación de leche o suero con las diferentes concentraciones de lacasa, se fueron tomando muestras cada 60 minutos durante 6 horas.

### 3.8 Parada de la reacción, extracción y análisis cromatográfico

Seguidamente a la toma de la muestra cada hora, para realizar el análisis cromatográfico de las muestras de leche y suero, después de la adición de la enzima lacasa, se procedió de la siguiente manera:

- Se mezcló  $2 \text{ mL}$  de cada muestra con  $5 \text{ mL}$  de acetonitrilo para posterior agitación durante 10 minutos en vórtex. Se centrifugó a  $9500 \text{ rpm}$  por 15 minutos y  $5 \text{ mL}$  de sobrenadante se depositó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó los  $5 \text{ mL}$  de sobrenadante a baño maría hasta sequedad y el residuo de antibiótico se reconstituyó con  $2 \text{ mL}$  de agua grado HPLC, cada muestra se hizo pasar a través de un filtro de jeringa marca Phenex (Phenomenex) RC (celulosa regenerada) de  $26 \text{ mm}$  de  $0,2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro.



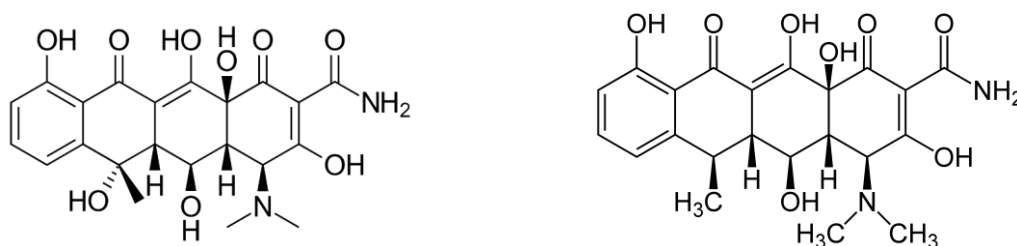
**Figura 1-3:** Esquema de la adición de las tres concentraciones de enzima lacasa a las muestras de leche o suero con oxitetraciclina (OTC).

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

Se inyectó 20 µL de la muestra filtrada en un cromatógrafo líquido marca Perkin Elmer con detector UV/Visible, con columna analítica C18 de 5 µm de tamaño de partícula, 256 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno, a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, la fase móvil fue (%v/v) 20:80 de acetonitrilo y solución de EDTA al 0,1% ajustado a pH 3,8 con ácido fosfórico concentrado.

Se aplicó elución isocrática siguiendo la técnica para doxiciclina y oxitetraciclina, como se indica en el estudio de Alsager et al. (2018) y Fletouris et al. (2008), respectivamente. La oxitetraciclina y la

doxiciclina son tetraciclinas con una estructura química muy similar como se muestra en la Figura 2-3: motivo por el cual se utilizó la técnica descrita.



**Figura 2-3:** Estructura química de la oxitetraciclina y doxiciclina

**Fuente:** (Universidad de Chile, 2007, pág. 50), Avances en Ciencias Veterinarias

Para el análisis cromatográfico se seleccionó una longitud de onda igual a 360 nm, previa la realización de un barrido espectral de una solución estándar. El estándar analítico tuvo una pureza de 98%.

### 3.9 Preparación de la curva de calibración

Los valores de la curva de calibración realizados en leche fueron: 200  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. A continuación, se detalla su preparación:

Para preparar la solución 200  $\mu$ M de oxitetraciclina, se pesó 0.0235 g de OTC para diluir con una varilla de vidrio en un vaso de precipitación de 50 mL, con una pequeña cantidad de leche. Después, se agregó la leche con la OTC disuelta en un balón de aforo de 250 mL. El vaso en el que se disolvió la OTC, se enjuagó con leche y se depositó en el balón de aforo hasta completar los 250 mL.

Para obtener 150  $\mu$ M de OTC a partir de la solución madre, se tomó 37,5 mL de ésta y se agregó 12,5 mL de leche.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$200 \mu M * V_1 = 150 \mu M * 50 mL$$

$$V_1 = 37,5 mL$$

Para obtener 100  $\mu$ M de OTC a partir de la solución madre, se tomó 25 mL de ésta y se agregó a 25 mL de leche.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$200 \mu M * V_1 = 100 \mu M * 50 mL$$

$$V_1 = 25 mL$$

Para obtener 50  $\mu M$  de OTC a partir de la solución madre, se tomó 12,5 mL de ésta y se agregó a 37,5 mL de leche.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$200 \mu M * V_1 = 50 \mu M * 50 mL$$

$$V_1 = 12,5 mL$$

Para obtener 10  $\mu M$  de OTC a partir de la solución 200  $\mu M$ , se tomó 1 mL de ésta y se agregó a 47,5 mL de leche.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$200 \mu M * V_1 = 10 \mu M * 50 mL$$

$$V_1 = 2,5 mL$$

Se realizó la lectura cromatográfica para establecer la curva de calibración. Los estándares de la curva de calibración se sometieron al mismo procedimiento de extracción que las muestras.

### **3.10 Análisis estadístico**

El Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor de medidas repetidas sirve para analizar la varianza de un factor asociada a una variable dependiente cuantitativa. Esta herramienta estadística permite establecer si existe diferencia en la media de más de dos grupos.

Para el presente estudio se aplicó un Análisis de Varianza de medidas repetidas, para determinar la existencia o no de diferencia estadística significativa, a un nivel de confianza  $\alpha=0,05$ , entre cada uno de los tiempos de muestreo, los pretratamientos y los tratamientos enzimáticos. La



prueba estadística de Bonferroni permitió la comparación de pares de medias, para especificar entre qué grupos ocurrió diferencia estadística significativa.

Para llevar a cabo el análisis estadístico se empleó el programa informático SAS (versión 9).

### **3.11 Análisis técnico - económico**

Según los datos reportados por la FAO, la producción de leche de vaca en Ecuador en el año 2018 se estableció en poco más de 1.500.000 toneladas de leche (FAOSTAT, 2020). Una leche contaminada con antibióticos debe ser retirada de la cadena de suministro. Los antibióticos se manifiestan en la leche cuando una vaca se enferma y es tratada con dichos medicamentos.

La cantidad de leche que puede contaminarse está determinada por la raza de la vaca. En Ecuador, las vacas lecheras como Holstein-Friesian puede alcanzar hasta 25 L e incluso 50 L en dos ordeños, en algunos casos. Brown Swiss es la raza más extendida del país y puede producir hasta 25 L de leche al día, las vacas Jersey llegan hasta los 28 a 30 L al día y Gir Orlando puede producir 20 L diarios (Jara y Maldonado, 2011).

Mientras tanto, el periodo de retiro de leche en vacas consiste en el intervalo de tiempo transcurrido entre la última administración del medicamento y el ordeño para garantizar al consumidor un alimento con una concentración del fármaco por debajo del LMR. El periodo de retiro del antibiótico varía en dependencia del tipo. Para la oxitetraciclina hidrocloreto el tiempo de retiro es 3 días. La oxitetraciclina LA de 200 mg mL<sup>-1</sup> y 300 mg mL<sup>-1</sup> tienen tiempos de 4 días y 6 días, respectivamente (Parra et al., 2003).

Suponiendo que se enferma una vaca, se debe descartar 25 L de leche aproximadamente, y tomando en consideración 3 días, se obtiene un mínimo de 75 L. Es el mínimo volumen cuantificable de leche a descartar. No se puede predecir ni el número de vacas que pueden enfermarse, ni la frecuencia con la que puedan adquirir alguna infección como mastitis, metritis, neumonía o parasitosis y tampoco se puede predecir cuantas veces en un año se requerirá el uso de antibióticos. Un dato muy interesante citado por Betancur (2015), es que la raza Holstein presenta mayor susceptibilidad a mastitis con relación a otras.

Así, es amplia la bibliografía que cita esfuerzos por degradar antibióticos en leche (descrita en el apartado de antecedentes). Si se descarta en el suelo o se descarta en ríos se contribuye a aumentar

la contaminación. No es justificable que sólo se espere volúmenes inmensos para producir contaminación puesto que esta tiene lugar como resultado de muchas actividades ganaderas, pero todas contaminan y si se suman generan un impacto ambiental gravísimo.

Por ejemplo, según la revisión de Kemper (2008), la resistencia bacteriana ocurre porque en el entorno ambiental existen medicamentos de múltiples actividades humanas como uso de antibióticos en hospitales, excretas de humanos y animales, aguas residuales de industrias químico-farmacéuticas, etc.; reducir una de ellas ya constituye un paso para la mitigación ambiental, esto se respalda con lo dicho por Graham et al. (2016), que mientras menos residuos de antibióticos se tenga en el ambiente menor probabilidad existe de que aparezcan superbacterias.

Se han encontrado sustancias antibióticas en aguas residuales y muestras de efluentes, en aguas superficiales e incluso subterráneas y agua potable a nivel mundial. Con respecto a los antibióticos en la cría de animales, sus metabolitos o productos de degradación pueden alcanzar el medio acuático mediante la aplicación de estiércol o leche a áreas usadas agrícolamente, ocurre lixiviación en capas más profundas de la tierra y todo esto a causa de la escorrentía. Así, los suelos pueden actuar como fuente de contaminación antibiótica del medio ambiente acuático (Kemper, 2008).

La concentración de antibióticos en ciertas capas del suelo se denomina terracumulación, convirtiéndose en un reservorio de antibióticos, que contribuye a su propagación hacia otros terrenos y a contaminar aguas subterráneas (Kemper, 2008).

Si se acostumbra a arrojar residuos con antibióticos sin pretratamiento, aunque sea en un pequeño terreno, puede ocurrir una acumulación similar a cuando el estiércol contaminado en el suelo excede la tasa de degradación de los antibióticos. La terracumulación puede conllevar a una alteración del ambiente microbiano, como la transferencia del material genético de una bacteria resistente a una bacteria sensible (Kemper, 2008).

De acuerdo a la revisión de Kemper (2008), con respecto a la resistencia a las tetraciclinas en el suelo, primero ocurrió en las bacterias en contacto con estiércol que se abonó al suelo, pero luego esa resistencia se evidenció en bacterias del suelo sin contacto con estiércol y bacterias de agua subterráneas, consecuencia de la transferencia de factores de resistencia.

Los estudios experimentales sobre la actividad antimicrobiana de la tetraciclina unida al suelo han demostrado que a pesar de que estos compuestos están estrechamente adsorbidos por partículas

del suelo, permanecen activos, mostrando efectos antimicrobianos que pueden influir en la selección de bacterias resistentes a los antibióticos en el medio terrestre. Las tetraciclinas pueden permanecer en el suelo durante mucho tiempo y esto se debe a la formación de complejos de calcio, que se encuentra en el suelo en altas concentraciones (Kemper, 2008).

El impacto de varios antibióticos contra las bacterias que viven en las aguas residuales ha sido documentado. En aguas residuales, de alcantarillado y de plantas de tratamiento, se han detectado bacterias resistentes y multirresistentes, posiblemente ingresando a la cadena alimentaria directamente a través de lodos de depuradora utilizados como fertilizantes o aguas residuales que sirven para riego (Kemper, 2008).

En condiciones de prueba en sistemas acuáticos, la mayoría de los compuestos antibióticos examinados han sido persistentes, mientras que solo unos pocos han sido parcialmente biodegradados. Para descubrir la ocurrencia de medicamentos antimicrobianos en aguas superficiales y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, varios estudios han sido realizado en Alemania, Suiza y los Estados Unidos (Kemper, 2008).

Por lo general, no se espera que las penicilinas y las tetraciclinas sean encontradas en el ambiente acuático debido a la fácil hidrólisis de penicilinas y la precipitación y acumulación de tetraciclinas. Sin embargo, estas sustancias se han detectado en niveles bajos en muestras de aguas superficiales de EE. UU. y superiores niveles en el flujo de agua por tierra (Kemper, 2008).

La presencia de aislados bacterianos resistentes a la tetraciclina en lagunas y agua subterránea han sido citados por Kemper (2008). Sin embargo, el aporte de antibióticos por uso agropecuario es el origen menor de los antimicrobianos en el medio acuático.

No obstante, la difusión de los antibióticos hacia el suelo y el agua es resultado de la falta de un proceso para degradar residuos, para este caso los antibióticos en la leche. Este estudio permitió realizar dos posibles vías de implementación de un proceso sencillo que pueda ser llevada a cabo.

En primer lugar, la enzima utilizada en la presente investigación fue una lacasa de *Trametes versicolor*, su costo fue \$167,14 sin IVA el gramo, con el valor del impuesto fue \$187,20.

La concentración suficiente para conseguir una degradación por debajo del LMR de oxitetraciclina fue 0,1 mg L<sup>-1</sup> de lacasa. Considerando un volumen de 75 L, resultado del análisis técnico realizado anteriormente, se debería añadir una cantidad de lacasa de 7,5 mg para obtener la concentración que provoque degradación del antibiótico.

Para degradar un volumen de 75 litros de leche contaminada se necesita menos de 10 mg. Los 7,5 mg de lacasa se resumen en \$1,25 para preparar la solución degradante. Es decir, \$1,25 cuesta degradar 75 litros de leche contaminada. El costo podría verse disminuido si la producción de la enzima se lo haría en el país o a su vez se podría tratar investigaciones con extractos fúngicos de *Trametes versicolor*.

El costo de mantenimiento dependerá del número de ganado vacuno enfermo y de la periodicidad de la infección.

También se puede aplicar un fraccionamiento por acidificación de la leche para obtención del suero. Se puede realizar una descremación previa. Para realizar la obtención de suero se utilizó una cantidad mínima de ácido clorhídrico concentrado, alrededor de 2 gotas para 250 mL. El costo de los 500 mL de ácido clorhídrico bordea los \$77,83.

Para una cantidad de 75 L se necesitaría 30 mL de HCl. Entonces, para obtener suero de 75 L de leche se invertiría \$4.67.

La obtención de crema, si se desea destinar a industrias alimenticias que elaboran productos lácteos derivados se necesitaría de una descremadora. La descremación podría hacerse dentro de la empresa que comercializa productos derivados de la leche o alimentos que requieran como ingrediente base. No obstante, puesto que el trabajo está orientado para el ganadero, el costo de una descremadora de 100 L de capacidad, según varios sitios de internet, es de \$380 y alcanza hasta los \$8500 dependiendo del volumen y funciones adicionales del equipo.

En total el gasto invertido por el ganadero sería alrededor de \$625 tomando en cuenta la descremadora de 100 L. Es decir, habría un costo de implementación de más o menos \$625.

La periodicidad del empleo de la descremadora sería en función de su utilidad, siendo \$0,09 el kilovatio hora en la Sierra. Es decir, el costo de implementación del proceso sería por debajo de los \$1000, tomando en cuenta la implementación de posibles accesorios de instalación y mano de obra. El costo para mantener el proceso estaría por debajo de los \$5 considerando un volumen mínimo mensual de leche contaminada, resultado obtenido del gasto mínimo de la enzima, del HCl, consumo eléctrico y mano de obra. Suponiendo un uso de la descremadora de 3 días al mes, dado que se ha enfermado una vaca el consumo sería:

$$\text{Consumo}^1 = \frac{1500 \text{ w} * 0,5 \text{ horas} * 3 \text{ días}}{(kWh)1000}$$

$$\text{Consumo} = 2,25 \frac{kWh}{mes} \times \frac{\$0,09}{1 kWh} = \frac{\$0,20}{mes}$$

Si se enferman 5 vacas al año sería \$1,00

En un análisis económico más detallado, con base en el diseño de procesos para Ingeniería Química (Jiménez, 2013). Se consideraron los siguientes parámetros:

### **Capacidad de la planta**

Se tomará como referencia  $500 \frac{L}{año}$

### **Inversión fija ( $I_F$ )**

La inversión fija comprende los implementos necesarios para desarrollo del proceso, para este trabajo se necesitó una descremadora de 100 L: \$380.

### **Capital de trabajo ( $I_w$ )**

El capital de trabajo comprende el dinero para mantener el proceso en marcha y dado que no resulta un procedimiento complejo se estimó \$100 al año.

### **Inversión total ( $I$ )**

Resulta de la suma entre la inversión fija y el capital de trabajo, es decir, \$711.

### **Materia prima ( $MP$ )**

$$\text{Leche: } \frac{75 L}{1 \text{ vaca enferma}} \times \frac{\$0,42}{1 L} \times \frac{5 \text{ vacas enfermas}}{año} = \frac{\$157,50}{año}$$

---

<sup>1</sup> Fórmula para obtener el consumo eléctrico en Ecuador

### Costo anual del consumo de energía ( $E$ )

El consumo anual de energía eléctrica para llevar a cabo el proceso de descremación se puede obtener con la fórmula de consumo anotada anteriormente y que representa:  $E = 1,00 \frac{\$}{\text{año}}$

### Insumos y materiales, catalizador

1 g de lacasa cuesta \$167,14 pero la pequeña cantidad de lacasa utilizada y para el volumen mínimo de leche contaminada se obtuvo:

$$75 \text{ L} \times 5 \text{ vacas al año} = 375 \text{ L al año} \frac{7,5 \text{ mg de lacasa}}{75 \text{ L}}$$

$$375 \frac{\text{L}}{\text{año}} \times \frac{7,5 \text{ mg de lacasa}}{75 \text{ L}} \times \frac{\$167,14}{1000 \text{ mg de lacasa}} = \frac{\$6,27}{\text{año}}$$

$$\text{Enzima lacasa: } \frac{\$6,27}{\text{año}}$$

Los 500 mL de HCl bordean los \$77,83 y después de aplicar el cálculo anterior se obtuvo:

$$30 \text{ mL HCl} \times 5 \text{ vacas al año} = 150 \text{ mL al año}$$

$$150 \frac{\text{mL}}{\text{año}} \times \frac{\$77,83}{500 \text{ mL}} = \frac{\$23,35}{\text{año}}$$

### Costo de operación del proceso ( $C$ )

$$C = aI_F + bMP + cE + dMO - pSP$$

$aI_F$  comprende la inversión fija, que comprende los componentes principales de un proceso más la inversión de equipo auxiliar,  $bMP$  corresponde al costo de materia prima,  $cE$  representa el costo de uno o varios servicios (electricidad, por ejemplo),  $dMO$  es el costo de mano de obra y  $pSP$  es el precio de cada subproducto que se pudiera producir en el proceso. Esta fórmula puede ser modificada en función del proceso que se realice, el objetivo que se persigue y el entorno en el que se desenvuelve.

$$C = \frac{\$380,00}{\text{año}} + \frac{\$1,00}{\text{año}} + \frac{\$6,27}{\text{año}} + \frac{\$23,35}{\text{año}}$$

$$C = \frac{\$410,62}{\text{año}}$$

Constituye una antítesis colocar a la leche contaminada (materia prima) como un costo de operación, puesto que una vez que se encuentra residuos de antibióticos por encima del LMR, pierde su valor total. Además, el proceso de este estudio tuvo como objetivo disminuir la carga residual de oxitetraciclina en leche que se acostumbra a verter al medio ambiente para mitigar su contaminación y no obtener un producto reutilizable en su totalidad. El propósito de contribuir en una parte a resolver el problema de la resistencia de antibióticos, representa un ahorro de dinero que se gastaría para investigar nuevas drogas con acción antimicrobiana. Según Ahern y Richardson (2012), el costo de la resistencia a los antimicrobianos para el sistema de atención de salud humana de los Estados Unidos se estimó entre \$100 millones y \$30 mil millones anuales.

### **Cálculo de ventas anuales (S)**

El costo de la crema de leche en el mercado de 200 g o 0,2 kg es \$1,49 y 1 kg de leche corresponde a 1 L de leche aproximadamente. Para la crema, aunque más densa, podemos asumir 0,2 L. Si realizamos un cálculo podemos obtener el precio de 1 L (1 kg) de crema de leche que sería \$7,45.

Se puede suponer que al enfermarse 5 vacas la producción de leche sería más o menos  $400 \frac{L}{T_{prod}}$  *de leche* que se utilizó para el cálculo del valor de la MP, podemos obtener 4% de crema y el 90% de suero. Así tenemos  $16 \frac{L}{T_{prod}}$  *de crema* y  $360 \frac{L}{T_{prod}}$  *de suero*. Como el costo de operación de un proceso puede evaluarse por unidad de tiempo ( $\frac{\$}{\text{año}}$ ) o por unidad de producción ( $\frac{\$}{kg}$ ), las cifras para la crema y el suero serían  $\frac{\$119,20}{\text{año}}$  y  $\frac{\$126}{\text{año}}$  (\$0,35 el costo del suero), respectivamente. Finalmente, las ventas anuales de estos productos serían igual a  $\frac{\$245,20}{\text{año}}$ .

Una vez calculado el costo de operación del proceso (C) y las ventas anuales (S), podemos encontrar la utilidad o beneficio bruto (R) de la siguiente manera:

$$R = S - C$$

$$R = \frac{\$245,20}{\text{año}} - \frac{\$410,62}{\text{año}}$$

$$R = \frac{-\$165,42}{\text{año}}$$

El beneficio bruto a simple vista pareciera indicar que su implementación sería un proceso inviable y provocaría una pérdida de \$165,42. No obstante, esto podría cambiar mediante la conformación de un acopio único de procesamiento de leche contaminada, dónde pueda recolectarse la leche contaminada de todas las fincas ganaderas. Por ejemplo, Coronel y Paguay (2015), encontraron 91550,5 L de leche cruda contaminada y no apta para el consumo, que era destinada a la comercialización en la provincia del Azuay.

Esto incrementaría la cantidad de crema y suero reutilizable que conllevaría al aumento de dinero, puesto que la venta de productos derivados de la leche (como la crema) incrementa el valor económico si se compara con la venta de leche cruda. Además, la compra de la descremadora, se haría mediante el aporte económico de varios ganaderos y no de manera individual, esto reduciría el costo de implementación del proceso.

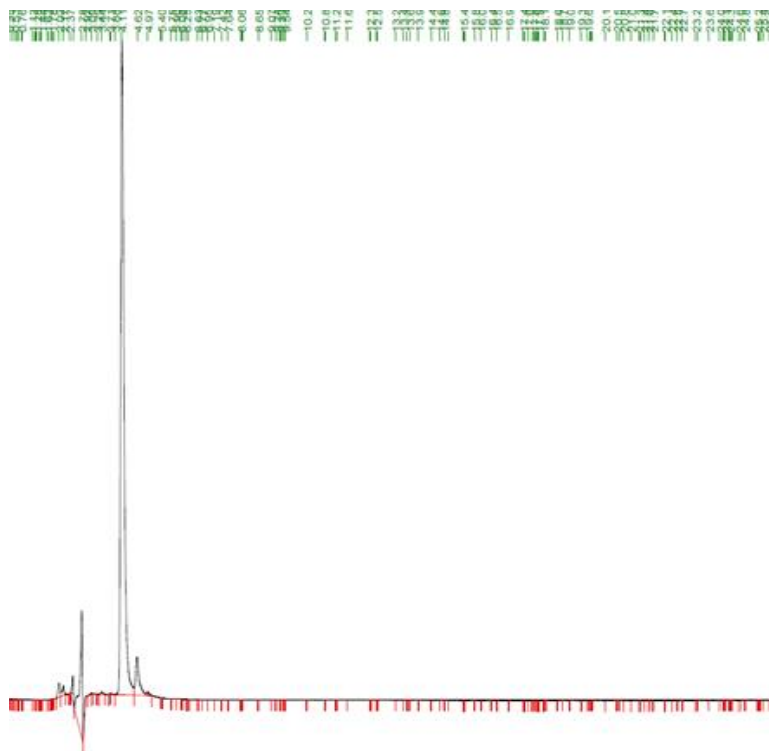


## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Determinación del tiempo de retención de la oxitetraciclina

Para determinar el tiempo de retención y localización exacta del pico de oxitetraciclina en los cromatogramas, se prepararon muestras con alta concentración del antibiótico y se analizaron en el cromatógrafo. En la Figura 1-4: se puede apreciar el cromatograma en estas muestras control positivo. El tiempo de retención para la oxitetraciclina fue de 4,11 minutos.



**Figura 1-4:** Muestra enriquecida con oxitetraciclina para detectar el tiempo de retención del antibiótico.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

#### 4.2 Efecto de las concentraciones de lacasa

En la Tabla 1-4 se presentan los valores medios de oxitetraciclina presente en las muestras de leche o suero y su evolución a lo largo de 6 horas en presencia de diferentes concentraciones de lacasa. En esta tabla se compara, además, el efecto de la concentración de lacasa dentro de cada uno de los pretratamientos a los que fue sometida la leche.

Previo a añadir la lacasa a las muestras, se observó que los valores de concentración de oxitetraciclina se presentaron en valores aproximados de 200, 188, 198 y 49  $\mu\text{M}$  en la leche cruda sin tratamiento, leche tratada térmicamente, leche descremada y suero, respectivamente.

Tanto en la leche cruda sin pre-tratamiento, como en la tratada térmicamente y la descremada, la presencia de lacasa, en cualquiera de sus concentraciones, redujo notablemente la concentración de oxitetraciclina presente en leche. Esta reducción significativa se produjo a cada hora en la que se tomó la muestra. Los niveles de oxitetraciclina encontrados a las 6 horas en estos tres tratamientos en presencia de lacasa varió entre 47,51 a 53,36  $\mu\text{M}$ . Si se hubiese alargado en el tiempo, posiblemente se hubiera encontrado niveles de oxitetraciclina más bajos.

En el caso del suero, el uso de lacasa, en cualquiera de sus concentraciones, produjo una muy ligera disminución de los niveles de oxitetraciclina, y aunque después de 6 horas se redujo con diferencia respecto al tiempo 0, esta disminución no fue más de 5  $\mu\text{M}$ .

Respecto al efecto de la concentración de lacasa en las muestras de leche cruda sin pre-tratamiento, tratada térmicamente o descremada, se observó una ligera disminución del nivel de oxitetraciclina presente en la muestra a medida que aumentó la concentración de lacasa. Sin embargo, no fueron muy evidentes ni proporcionales al aumento de la concentración de lacasa añadida. En el caso del suero, no hubo diferencias respecto a la cantidad de oxitetraciclina presente en la muestra a medida que aumentó la concentración de lacasa.

En el caso del suero, no hubo diferencias estadísticas significativa entre las diferentes concentraciones de lacasa usadas en este estudio sobre la degradación de oxitetraciclina en las muestras durante todo el periodo de estudio.

#### **4.3 Efecto de los pretratamientos de la leche**

En la Tabla 2-4 se presentan los valores medios de la concentración de oxitetraciclina en las muestras, comparando los pretratamientos de la leche dentro de cada una de las concentraciones de lacasa añadidas. El objetivo de esta agrupación y comparación fue determinar si los pretratamientos de la leche favorecen la degradación de residuos de OTC, conjuntamente con el uso de la enzima lacasa a diferentes concentraciones.

**Tabla 1-4:** Valores medios de concentración de oxitetraciclina ( $\mu\text{M}$ ) en muestras de leche<sup>1</sup> cruda, tratada térmicamente, descremada y suero, con presencia de diferentes concentraciones de lacasa durante 6 horas de contacto.

Pretratamiento <sup>1</sup>	Tiempo								
	0	Concentración de lacasa <sup>2</sup>	1	2	3	4	5	6	EEM
Leche cruda	200,00 <sup>a</sup>	Baja	160,48 <sup>bz</sup>	128,77 <sup>cz</sup>	100,32 <sup>dz</sup>	82,91 <sup>ez</sup>	62,52 <sup>fz</sup>	53,36 <sup>gz</sup>	10,10
	200,00 <sup>a</sup>	Media	150,90 <sup>by</sup>	126,25 <sup>cy</sup>	98,30 <sup>dy</sup>	79,69 <sup>ey</sup>	63,31 <sup>fz</sup>	50,30 <sup>gy</sup>	9,75
	200,00 <sup>a</sup>	Alta	148,64 <sup>bx</sup>	125,83 <sup>cy</sup>	95,81 <sup>dx</sup>	79,17 <sup>ey</sup>	60,80 <sup>fy</sup>	49,80 <sup>gx</sup>	9,76
	0,00	EEM	1,82	0,58	0,69	0,62	0,44	0,56	
Leche tratada térmicamente	188,28 <sup>a</sup>	Baja	157,12 <sup>b</sup>	126,60 <sup>cz</sup>	98,72 <sup>dz</sup>	80,13 <sup>ez</sup>	60,75 <sup>fz</sup>	50,71 <sup>gz</sup>	9,79
	182,87 <sup>a</sup>	Media	156,14 <sup>b</sup>	123,04 <sup>cy</sup>	96,87 <sup>dzy</sup>	76,18 <sup>ey</sup>	59,81 <sup>fy</sup>	48,89 <sup>gy</sup>	9,71
	181,52 <sup>a</sup>	Alta	155,70 <sup>b</sup>	122,35 <sup>cy</sup>	96,05 <sup>dy</sup>	75,31 <sup>ey</sup>	58,96 <sup>fy</sup>	48,08 <sup>gy</sup>	9,72
	2,06	EEM	0,38	0,68	0,50	0,77	0,30	0,41	
Leche descremada	198,92 <sup>a</sup>	Baja	155,29 <sup>b</sup>	122,37 <sup>cz</sup>	96,34 <sup>dz</sup>	75,75 <sup>ez</sup>	59,48 <sup>fz</sup>	49,59 <sup>gz</sup>	10,08
	199,35 <sup>a</sup>	Media	154,55 <sup>b</sup>	121,51 <sup>czy</sup>	95,40 <sup>dy</sup>	74,76 <sup>ezy</sup>	59,46 <sup>fz</sup>	48,56 <sup>gy</sup>	10,11
	199,11 <sup>a</sup>	Alta	153,82 <sup>b</sup>	120,51 <sup>cy</sup>	94,28 <sup>dx</sup>	73,62 <sup>ey</sup>	57,34 <sup>fy</sup>	47,51 <sup>gx</sup>	10,19
	0,12	EEM	0,33	0,33	0,31	0,36	0,36	0,31	
Suero	49,18 <sup>a</sup>	Baja	48,34 <sup>ab</sup>	47,31 <sup>b</sup>	46,50 <sup>b</sup>	46,03 <sup>c</sup>	45,60 <sup>c</sup>	44,91 <sup>c</sup>	0,32
	49,29 <sup>a</sup>	Media	48,41 <sup>ab</sup>	47,35 <sup>bc</sup>	46,48 <sup>cd</sup>	46,05 <sup>de</sup>	45,51 <sup>ef</sup>	44,90 <sup>f</sup>	0,32
	49,37 <sup>a</sup>	Alta	48,49 <sup>a</sup>	47,42 <sup>b</sup>	46,78 <sup>bc</sup>	46,01 <sup>cd</sup>	45,35 <sup>de</sup>	44,82 <sup>e</sup>	0,34
	0,05	EEM	0,21	0,18	0,10	0,22	0,13	0,19	

<sup>2</sup> Concentración de lacasa en leche o suero: 0,1 mg L<sup>-1</sup> (baja), 0,2 mg L<sup>-1</sup> (media) y 0,3 mg L<sup>-1</sup> (alta).

<sup>a-g</sup> Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticas entre medias (P < 0,05).

<sup>z-x</sup> Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas entre medias (P < 0,05).

<sup>3</sup> EEM: error estándar de la media.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

Los pretratamientos de desuerado y térmico aplicados a la leche en este estudio redujeron significativamente la cantidad de oxitetraciclina en las muestras. Sin embargo, el descremado casi no redujo, en sí, la cantidad de OTC en la muestra de leche (aprox. 199  $\mu$ M vs 200  $\mu$ M en la leche cruda), al tiempo cero.

El pretratamiento que produjo una mayor reducción de OTC fue el desuerado, con una menor presencia del antibiótico en el suero (aprox. 49  $\mu$ M, lo que significa una reducción del 75% de la muestra original), seguido del pretratamiento térmico (con un residuo de antibiótico de 181-188  $\mu$ M, reducción de un 12% aprox.), al tiempo cero. La reducción del 75% de OTC en el suero fue debido a un reparto del antibiótico, el cual migró a la fase caseínica. Es decir, no se redujo por una degradación de la molécula, tal y como sí sucedió con el pretratamiento térmico.

En la Tabla 3-4 se aprecia el porcentaje de degradación de oxitetraciclina a través del tiempo a las tres concentraciones de lacasa probadas, por cada pretratamiento aplicado. Esta presentación de los datos en porcentaje nos permite observar de mejor manera los efectos tiempo, pretratamiento y concentración de lacasa combinados sobre la cantidad de antibiótico residual en las muestras después del pretratamiento.

Se puede observar, por ejemplo, que la degradación del antibiótico a la primera hora en presencia de lacasa, respecto al tiempo 0, fue más rápida en la leche cruda (24% de reducción), seguida de la leche descremada (22 % de reducción), pasteurizada (16% de reducción), y finalmente en el suero, en el cual casi no se redujo la cantidad de antibiótico por efecto de la lacasa (menos del 2% de reducción).

A lo largo del tiempo de degradación, los análisis mostraron una reducción gradual y significativa de la concentración de antibiótico en las muestras de leche cruda, pasteurizadas y descremadas, de entre un 74 y 76% de reducción a las 6 horas de la aplicación de la lacasa. Sin embargo, en las muestras de suero, a pesar de que el pretratamiento redujo significativamente la cantidad de antibiótico, el efecto de la lacasa en estas muestras casi no degradó la OTC.

A pesar de ello, tal y como se observó en la Tabla 1-4, el simple hecho de obtener el suero, fue suficiente para obtener valores residuales de OTC similares a aquellos obtenidos combinando los otros pretratamientos con el uso de lacasa.

En todo caso, se puede decir que los pretratamientos térmico y descremado, junto con el uso de la lacasa influyen en la degradación de la oxitetraciclina.

**Tabla 2-4:** Valores medios de concentración de oxitetraciclina ( $\mu\text{M}$ ) en las diferentes muestras agrupadas en función de cada una de las tres concentraciones de lacasa para evidenciar la efectividad del pretratamiento<sup>1</sup>.

Concentración de lacasa <sup>2</sup>	Tiempo							
	0	Pretratamiento <sup>1</sup>	1	2	3	4	5	6
Baja	200,00 <sup>z</sup>	Leche cruda	160,48 <sup>z</sup>	128,77 <sup>z</sup>	100,32 <sup>z</sup>	82,91 <sup>z</sup>	62,52 <sup>z</sup>	53,36 <sup>z</sup>
	188,28 <sup>y</sup>	Leche tratada térmicamente	157,12 <sup>y</sup>	126,60 <sup>y</sup>	98,72 <sup>y</sup>	80,13 <sup>y</sup>	60,75 <sup>y</sup>	50,71 <sup>y</sup>
	198,92 <sup>z</sup>	Leche descremada	155,29 <sup>x</sup>	122,37 <sup>x</sup>	96,34 <sup>x</sup>	75,75 <sup>x</sup>	59,48 <sup>x</sup>	49,59 <sup>y</sup>
	49,18 <sup>x</sup>	Suero	48,34 <sup>w</sup>	47,31 <sup>w</sup>	46,50 <sup>w</sup>	46,03 <sup>w</sup>	45,60 <sup>w</sup>	44,91 <sup>x</sup>
	36,73	EEM	14,28	10,29	6,80	4,45	2,03	0,93
Media	200,00 <sup>z</sup>	Leche cruda	150,90 <sup>y</sup>	126,25 <sup>z</sup>	98,30 <sup>z</sup>	79,69 <sup>z</sup>	63,31 <sup>z</sup>	50,30 <sup>z</sup>
	182,87 <sup>y</sup>	Leche tratada térmicamente	156,14 <sup>z</sup>	123,04 <sup>y</sup>	96,87 <sup>zy</sup>	76,18 <sup>y</sup>	59,81 <sup>y</sup>	48,89 <sup>y</sup>
	199,35 <sup>z</sup>	Leche descremada	154,55 <sup>z</sup>	121,51 <sup>x</sup>	95,40 <sup>y</sup>	74,76 <sup>y</sup>	59,46 <sup>y</sup>	48,56 <sup>y</sup>
	49,29 <sup>x</sup>	Suero	48,41 <sup>x</sup>	47,35 <sup>w</sup>	46,48 <sup>x</sup>	46,05 <sup>x</sup>	45,51 <sup>x</sup>	44,90 <sup>x</sup>
	36,41	EEM	13,78	9,97	6,59	4,07	2,06	0,61
Alta	200,00 <sup>z</sup>	Leche cruda	148,64 <sup>x</sup>	125,83 <sup>z</sup>	95,81 <sup>z</sup>	79,17 <sup>z</sup>	60,80 <sup>z</sup>	49,80 <sup>z</sup>
	181,52 <sup>y</sup>	Leche tratada térmicamente	155,70 <sup>z</sup>	122,35 <sup>zy</sup>	96,05 <sup>z</sup>	75,31 <sup>y</sup>	58,96 <sup>y</sup>	48,08 <sup>y</sup>
	199,11 <sup>z</sup>	Leche descremada	153,82 <sup>y</sup>	120,51 <sup>y</sup>	94,28 <sup>y</sup>	73,62 <sup>x</sup>	57,34 <sup>x</sup>	47,51 <sup>x</sup>
	49,37 <sup>x</sup>	Suero	48,49 <sup>w</sup>	47,42 <sup>x</sup>	46,78 <sup>x</sup>	46,01 <sup>w</sup>	45,35 <sup>w</sup>	44,82 <sup>w</sup>
	36,29	EEM	13,63	9,87	6,35	3,97	1,83	0,54

<sup>2</sup> Concentración de lacasa en leche o suero: 0,1 mg L<sup>-1</sup> (baja), 0,2 mg L<sup>-1</sup> (media) y 0,3 mg L<sup>-1</sup> (alta).

<sup>z-x</sup> Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas entre medias ( $P < 0,05$ ).

<sup>3</sup> EEM: error estándar de la media.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

**Tabla 3-4:** Porcentajes (%) de oxitetraciclina remanente en muestras de leche<sup>1</sup> cruda, tratada térmicamente, descremada y desuerada (suero), con presencia de diferentes concentraciones de lacasa durante 6 horas de contacto.

Pretratamiento <sup>1</sup>	Tiempo								EEM
	0	Concentración de lacasa <sup>2</sup>	1	2	3	4	5	6	
Leche cruda	100,00 <sup>a</sup>	Baja	80,24 <sup>b</sup>	64,39 <sup>c</sup>	50,16 <sup>d</sup>	41,46 <sup>e</sup>	31,26 <sup>f</sup>	26,68 <sup>g</sup>	5,05
	100,00 <sup>a</sup>	Media	75,45 <sup>b</sup>	63,13 <sup>c</sup>	49,15 <sup>d</sup>	39,85 <sup>e</sup>	31,66 <sup>f</sup>	25,15 <sup>g</sup>	4,88
	100,00 <sup>a</sup>	Alta	74,32 <sup>b</sup>	62,92 <sup>c</sup>	47,91 <sup>d</sup>	39,59 <sup>e</sup>	30,40 <sup>f</sup>	24,90 <sup>g</sup>	4,88
Leche tratada Térmicamente	100,00 <sup>a</sup>	Baja	83,45 <sup>b</sup>	67,24 <sup>c</sup>	52,43 <sup>d</sup>	42,56 <sup>e</sup>	32,27 <sup>f</sup>	26,93 <sup>g</sup>	5,20
	100,00 <sup>a</sup>	Media	85,38 <sup>b</sup>	67,28 <sup>c</sup>	52,97 <sup>d</sup>	41,66 <sup>e</sup>	32,71 <sup>f</sup>	26,73 <sup>g</sup>	5,31
	100,00 <sup>a</sup>	Alta	85,78 <sup>b</sup>	67,40 <sup>c</sup>	52,91 <sup>d</sup>	41,49 <sup>e</sup>	32,49 <sup>f</sup>	26,49 <sup>g</sup>	5,36
Leche descremada	100,00 <sup>a</sup>	Baja	78,07 <sup>b</sup>	61,52 <sup>c</sup>	48,43 <sup>d</sup>	38,08 <sup>e</sup>	29,90 <sup>f</sup>	24,93 <sup>g</sup>	5,07
	100,00 <sup>a</sup>	Media	77,53 <sup>b</sup>	60,95 <sup>c</sup>	47,86 <sup>d</sup>	37,50 <sup>e</sup>	29,83 <sup>f</sup>	24,36 <sup>g</sup>	5,07
	100,00 <sup>a</sup>	Alta	77,25 <sup>b</sup>	60,52 <sup>c</sup>	47,35 <sup>d</sup>	36,97 <sup>e</sup>	28,80 <sup>f</sup>	23,86 <sup>g</sup>	5,12
Suero	100,00 <sup>a</sup>	Baja	98,29 <sup>ab</sup>	96,20 <sup>bc</sup>	94,55 <sup>cd</sup>	93,60 <sup>de</sup>	92,72 <sup>ef</sup>	91,32 <sup>f</sup>	0,66
	100,00 <sup>a</sup>	Media	98,21 <sup>ab</sup>	96,06 <sup>bc</sup>	94,30 <sup>cd</sup>	93,43 <sup>de</sup>	92,33 <sup>ef</sup>	91,09 <sup>e</sup>	0,66
	100,00 <sup>a</sup>	Alta	98,22 <sup>a</sup>	96,05 <sup>b</sup>	94,75 <sup>bc</sup>	93,19 <sup>cd</sup>	91,86 <sup>de</sup>	90,78 <sup>e</sup>	0,68

<sup>2</sup> Concentración de lacasa en leche o suero: 0,1 mg L<sup>-1</sup> (baja), 0,2 mg L<sup>-1</sup> (media) y 0,3 mg L<sup>-1</sup> (alta).

<sup>a-g</sup> Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticas entre medias (P < 0,05).

<sup>3</sup> EEM: error estándar de la media.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

Tal y como se explicó anteriormente, alrededor de un 25% de oxitetraciclina permaneció en suero luego del desuerado. Un resultado similar a esto lo obtuvo Cabizza et al. (2017), quien reportó un 23% de oxitetraciclina en suero y un 60% en caseína. Estos autores, aunque, su metodología no explica que el resto se haya repartido en la fracción de grasa, el resultado lo atribuyó a la imprecisión del método. En nuestro estudio, observamos que, en el pretratamiento de descremado, la presencia de OTC en la leche descremada fue de prácticamente igual a la leche cruda, lo que nos indica que el antibiótico no migra a la fracción grasa.

La enzima lacasa actúa degradando las moléculas de oxitetraciclina que no están fijadas a las proteínas lactoséricas. Según Shappell et al. (2017), la afinidad de antibióticos como la oxitetraciclina por las lactoproteínas séricas disminuye en presencia de la caseína; es así, que cuando los antibióticos están en leche, menor cantidad de estas moléculas permanecen unidas a las proteínas del lactosuero, en contraposición a cuando están exclusivamente en suero, aisladas de la caseína. En la investigación desarrollada por Alseger et al. (2018), se mencionó que los antibióticos disponibles en forma libre tienden a direccionarse a la caseína durante la fragmentación de la leche. Esto puede explicar que la degradación de la oxitetraciclina se vio más favorecida en leche que en suero, ya que es posible que la enzima lacasa actúe sólo con las moléculas libres de antibiótico.

En nuestro estudio, la lacasa y sus diferentes concentraciones, redujeron muy sutilmente la concentración de OTC en el suero, lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente. La razón de este fenómeno en el suero, puede explicarse porque la cantidad de oxitetraciclina libre en suero es escasa (Shappell et al., 2017) y, por lo tanto, si no existe más cantidad de antibiótico libre, de nada servirá adicionar más ni cantidad de lacasa, ni más tiempo en presencia de las mismas.

El pretratamiento de descremado usado en este estudio fue para analizar si éste es capaz de ejercer un efecto en la mejora del desempeño de la lacasa para degradar la oxitetraciclina. Al igual que en nuestro estudio, en el estudio de Hakk et al. (2016), se reportó que la oxitetraciclina se distribuyó en un porcentaje mayor al 99% en la leche descremada. Esta sería la causa que hizo que la concentración de oxitetraciclina en la leche descremada, al inicio del estudio experimental, fue de aprox. 199  $\mu\text{M}$ , ya que existió mayor afinidad de la oxitetraciclina por la fase acuosa de la leche descremada y no por la grasa, dado su comportamiento hidrosoluble, Gómez (2017).

Respecto al tratamiento térmico, de acuerdo a Cabizza et al. (2018), la temperatura alta no destruye la oxitetraciclina, pero también menciona que puede haber degradación por efecto del calor cuando el contenido de sólidos totales, como la grasa, en leche disminuye. En efecto, la investigación de Cabizza et al. (2018), se llevó a cabo en leche de oveja cuyo contenido de grasa es

mayor a la leche de vaca (Jeon et al., 2008). En nuestro estudio, al igual que lo reportado por Cabizza et al. (2018), el tratamiento térmico no fue muy relevante para la reducción de OTC, ni tampoco favoreció la degradación por parte de la lacasa.

En relación a la concentración de lacasa, hubo un ligero incremento en la velocidad de degradación de la oxitetraciclina al aumentar la concentración, que no justifica la duplicación o triplicación de la concentración utilizada. No obstante, aunque este crecimiento no sea muy amplio, la hipótesis que aquí se plantea consiste en que la leche tiene una matriz muy compleja que integra a compuestos carbohidratos, proteínas, lípidos y micronutrientes como vitaminas y metabolitos propios de la leche que tornan complicado estudiar las razones de una degradación que explique múltiples factores.

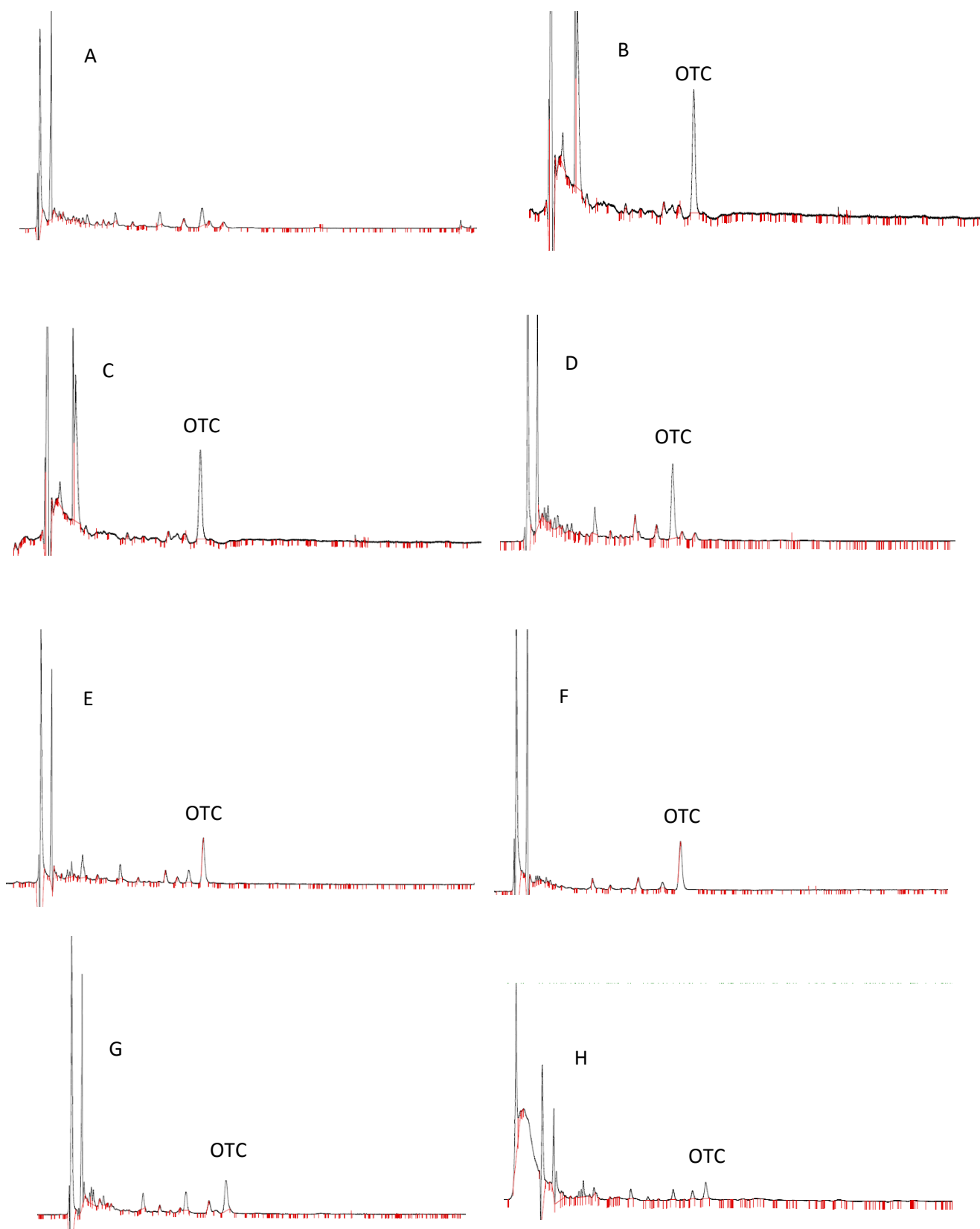
Por ejemplo, ciertas investigaciones con lacasas señalan que las enzimas no sólo toman como sustratos compuestos de estructura polifenólica como la oxitetraciclina, sino también proteínas de la leche (Struch et al., 2015). Por otra parte, está la presencia de antioxidantes propios de la leche que pueden afectar la actividad de la lacasa (Lindmark et al., 2000), por cuanto se supuso que el incremento de la cantidad de enzima lacasa podría mejorar su actividad. Pero en este estudio, con los pretratamientos y concentraciones utilizadas, no se cumplió esta hipótesis.

Según el tipo de antibiótico, existen algunos que se reparten de distinta manera y proporción en otros estudios de fraccionamiento de la leche (Ozdemir et al., 2018). La razón de esta distribución diferente de uno y otro antibiótico, se sustenta en factores como la fuente de origen de la leche, contenido de grasa, lipofilia del antibiótico, etc. (Shappell et al., 2017).

La hipótesis que se mencionó anteriormente se complementa con la complejidad para establecer una predicción completa de la actividad y dirección que pueda tener un antibiótico en la leche porque intervienen muchos factores, incluso en animales de la misma especie puede influir la raza del animal o la dieta diaria.

En la Figura 2-4 se puede observar un ejemplo de la disminución del pico de OTC en leche descremada a través del tiempo, mediante el empleo de una concentración de lacasa igual a 0,3 mg L<sup>-1</sup>. En la Figura 2-4: A se puede observar el cromatograma de la muestra de leche descremada libre de oxitetraciclina, mientras que las imágenes de la B a H muestran los cromatogramas de leche descremada con OTC a lo largo del tiempo experimental con lacasa.





**Figura 2-4:** Cromatogramas de soluciones de leche descremada con oxitetraciclina a diferentes concentraciones, inoculadas lacasa a una concentración igual a  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  (A) leche descremada sin oxitetraciclina (OTC), (B) tiempo 0, (C) tiempo 1, (D) tiempo 2, (E) tiempo 3, (F) tiempo 4, (G) tiempo 5, (H) tiempo 6.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

#### **4.4 Relación concentración de lacasa y tiempo de degradación de OTC en leche cruda sin pretratamiento**

Analizando la concentración de OTC en leche cruda sin pretratamiento, después de haber utilizado concentraciones de lacasa baja, media y alta; a lo largo del tiempo se encontró diferencia estadística significativa.

La efectividad de la lacasa se puede determinar a partir de la mayor remoción de OTC que se logra con cualquiera de las tres concentraciones de lacasa ensayadas.

Así, la concentración alta de lacasa logró más remoción de antibiótico en la leche cruda al tiempo 1 como se muestra en el Gráfico 1-4.

Al tiempo 2, en la leche cruda existió mayor degradación de OTC en leche con la concentración alta de lacasa. Sin embargo, como se observa en el Gráfico 1-4, los valores de la concentración de OTC de los tratamientos con concentración media y alta de lacasa son similares, debido a que no se evidenció diferencia estadística significativa.

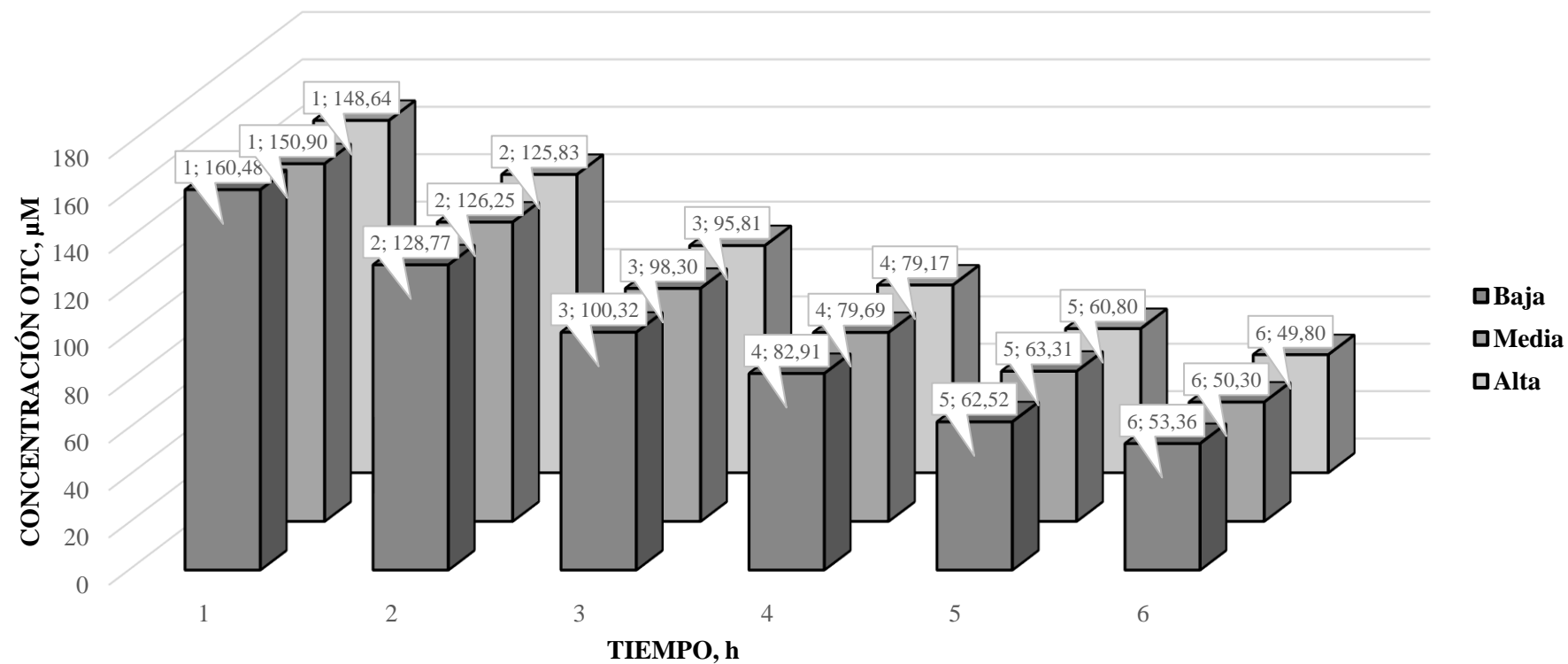
Se puede observar que la concentración de lacasa alta, fue la que más redujo la concentración de OTC al tiempo 3.

Durante el tiempo 4, se puede observar que no existió diferencia estadística significativa en la reducción de OTC, después de que se utilizó concentraciones de enzima media y alta. Cualquiera de estas concentraciones puede arrojar el mismo resultado.

En el transcurso de la quinta hora, la concentración de lacasa alta provocó mayor reducción en los niveles de oxitetraciclina en leche cruda sin pretratar.

Además, no se presentó diferencia estadística significativa en el descenso de las concentraciones de OTC cuando se utilizaron concentraciones baja y media de la enzima.

Finalmente, durante 6 horas transcurridas la concentración alta de enzima redujo mayor cantidad de oxitetraciclina. La diferencia estadística significativa se extiende para todas las concentraciones de lacasa ensayadas para reducir OTC.



**Gráfico 1-4:** Concentración de oxitetraciclina (OTC) en leche cruda a través del tiempo, luego de emplear concentraciones de lacasa baja, media y alta.

Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.

#### **4.5 Relación concentración de lacasa y tiempo de degradación de OTC en leche pretratada térmicamente**

Durante el tiempo 1, no se evidenció diferencia estadística significativa en la reducción de los niveles de OTC entre las tres concentraciones de lacasa. En el Gráfico 2-4 se puede apreciar que los valores son muy ambiguos.

En el Gráfico 2-4 también se puede observar la ausencia de diferencia estadística significativa entre las concentraciones media y alta de enzima, de manera que cualquiera de estas dos concentraciones funcionó para reducir en mayor medida los niveles de OTC.

Cualquiera de las concentraciones de lacasa media o alta resultó eficaz para reducir más oxitetraciclina al tiempo 3, ya que no se evidenció diferencia estadística significativa.

Al tiempo 4 se puede observar que se consigue el mismo resultado al usar la concentración media o la concentración alta de enzima para provocar un mayor descenso en los niveles de OTC, dado que no existió diferencia estadística significativa.

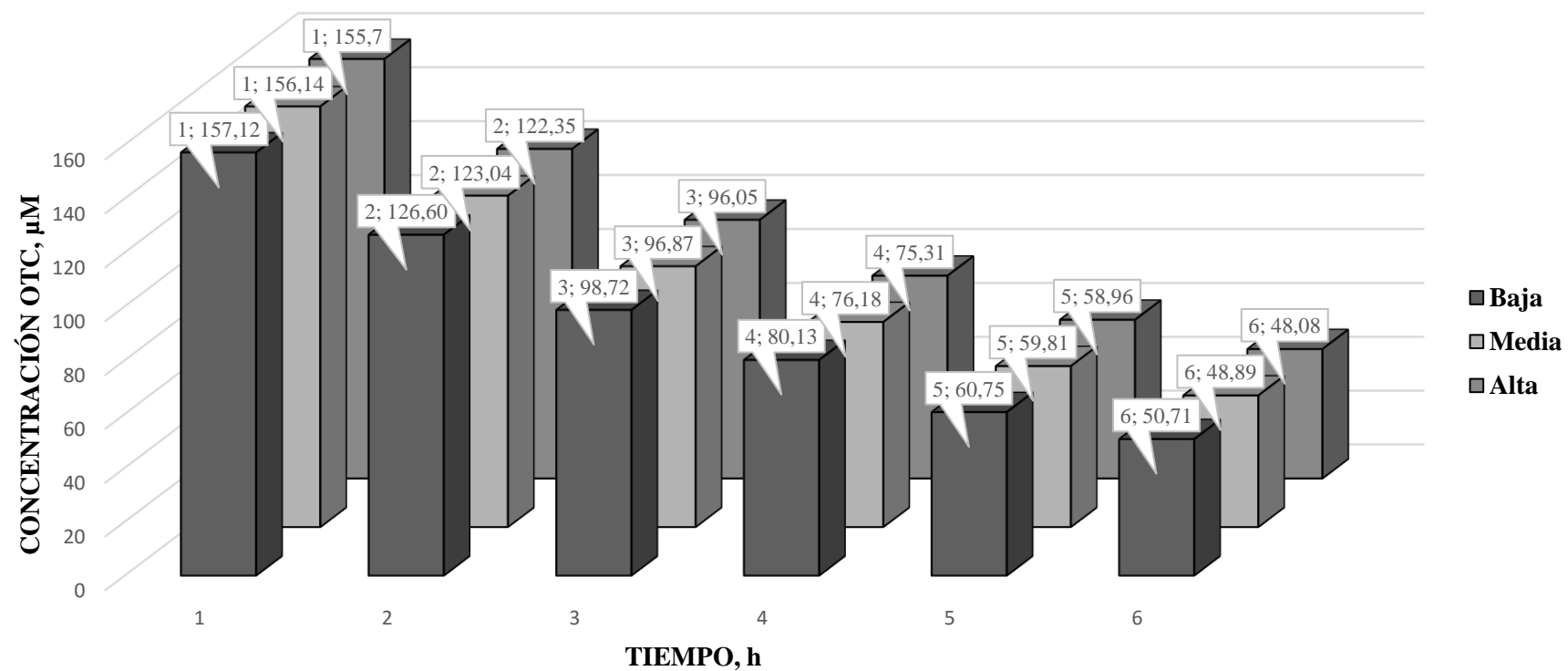
Al tiempo 5 no existió diferencia estadística significativa entre las concentraciones media y alta de lacasa, por cuanto cualquiera de las dos concentraciones sirvió para disminuir la OTC a su nivel más bajo.

Al tiempo 6, tampoco se evidenció diferencia estadística significativa entre las concentraciones media y alta de lacasa. Cualquier concentración de estas dos disminuyó en mayor medida la concentración de OTC.

#### **4.6 Relación concentración de lacasa y tiempo de degradación de OTC en leche descremada**

No se presentó diferencia estadística significativa en la reducción de los niveles de OTC entre las diferentes concentraciones de lacasa probadas. Cualquiera de las concentraciones de enzima ayudó a reducir los niveles del antibiótico durante la primera hora. Esta diferencia se ve un poco marcada en la muestra de leche descremada con una concentración alta de lacasa. Sin embargo, entre la concentración baja y media dio el mismo resultado usar cualquiera de las dos concentraciones.

Los resultados se pueden apreciar en el Gráfico 3-4.



**Gráfico 2-4:** Concentración de oxitetraciclina (OTC) en leche térmizada a través del tiempo, luego de emplear concentraciones de lacasa baja, media y alta.

Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.

Durante la segunda hora la concentración media y alta de enzima fueron las que más disminuyeron los niveles de oxitetraciclina. No hubo diferencia estadística significativa entre estas. Mientras tanto, a la tercera hora, se puede observar que la concentración alta de enzima fue la que más redujo los niveles de oxitetraciclina en la muestra de leche descremada.

Se puede observar la ausencia de diferencia estadística significativa en los niveles de OTC cuando se usan concentraciones media y alta de lacasa, durante la cuarta hora.

Durante el tiempo 5 o quinta hora, la concentración alta de lacasa reflejó mayor descenso en la concentración de OTC. No se distinguió diferencia significativa entre las concentraciones baja y media de enzima.

Durante la última hora, la diferencia significativa se extendió a cada una de las concentraciones de lacasa ensayadas, siendo la concentración más alta la que más oxitetraciclina redujo. En el Gráfico 3-4 se puede observar estos resultados.

#### **4.7 Relación concentración de lacasa y tiempo de degradación de OTC en suero**

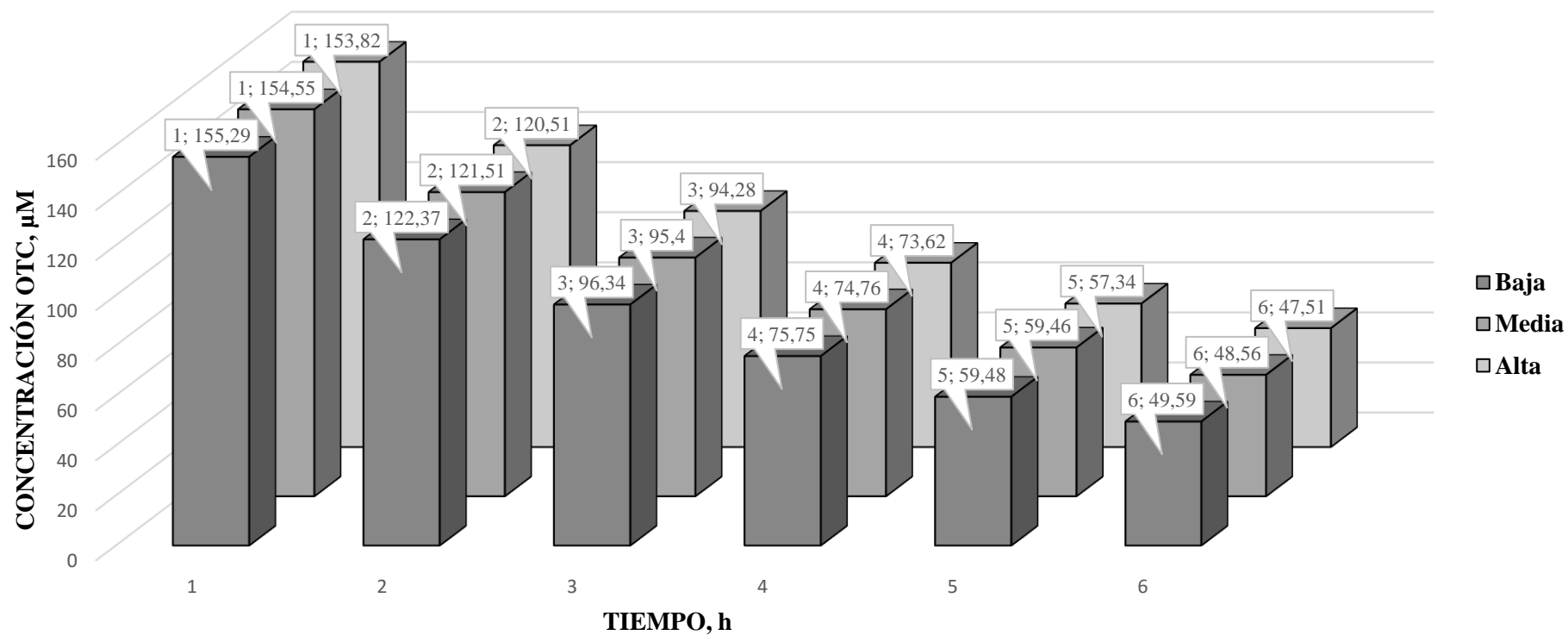
Se puede apreciar que a primera vista la concentración más baja de lacasa redujo más oxitetraciclina en suero. Sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa en la reducción de OTC al momento de aplicar en el suero cada una de las tres concentraciones de lacasa.

Por lo tanto, cualquiera de las tres concentraciones de enzima fue suficiente para conseguir la misma remoción del antibiótico.

El efecto en la reducción de OTC en el suero debido a la acción de la lacasa fue muy similar a lo largo del tiempo, sin que se aprecie una reducción significativa entre cada hora. De la misma manera el incremento en la concentración de enzima careció de un impacto significativo para provocar una mayor reducción de OTC en suero.

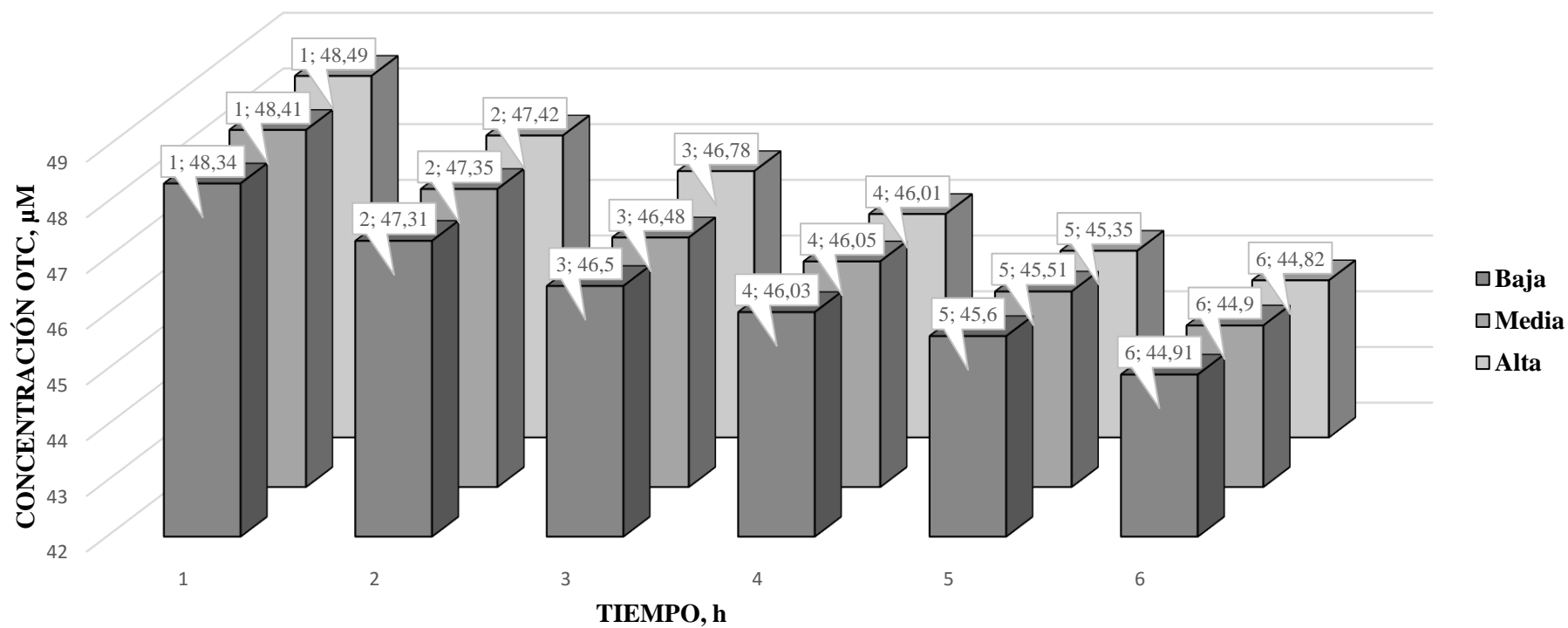
En el Gráfico 4-4 se puede distinguir que el comportamiento de la lacasa frente a la reducción de OTC en suero no varió tan significativamente a través del tiempo, en contraste a como lo fue con la leche cruda y los otros pretratamientos.

Pese a que el gráfico pudiera señalar lo contrario, esto se debe al tamaño de la escala de representación.



**Gráfico 3-4:** Concentración de oxitetraciclina (OTC) en leche descremada a través del tiempo, luego de emplear concentraciones de lacasa baja, media y alta.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.



**Gráfico 4-4:** Concentración de oxitetraciclina (OTC) en suero a través del tiempo luego de haber empleado concentraciones de lacasa baja, media y alta.

Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.



#### **4.8 Disminución de la contaminación del suelo y agua por efecto de la lacasa**

La disminución de la contaminación del suelo y del agua resulta de un efecto indirecto que se consigue al tratar la leche con residuos de antibióticos, específicamente la oxitetraciclina. Luego de la culminación de la presente investigación, la leche puede tener dos destinos finales.

Se puede someter a un pretratamiento de fraccionamiento exclusivamente para la obtención del suero, este puede presentar alrededor de un 25% de la concentración de partida que fue 200  $\mu\text{M}$ , este valor se encuentra por debajo del LMR establecido por el Codex Alimentarius (2015), que estipula una concentración de 100  $\mu\text{M}$  para inocuidad de productos lácteos.

De manera que el suero puede servir para alimentación humana o animal. De esta forma se conseguiría evitar desechar todo el producto al suelo o agua y reducir así la cantidad de antibiótico que se vierte al medio ambiente.

Sin embargo, la porción de caseína y de grasa de la leche puede contener un 75% de OTC, lo cual representaría un problema. Por lo tanto, se puede emplear la enzima directamente en la leche cruda para reducir la concentración de OTC hasta su nivel más pequeño (aproximadamente 25% al término de 6 horas).

Si se desecharía la leche en estas condiciones también se podría reducir la carga de antibiótico destinada al suelo o al agua y se generaría un efecto positivo en la disminución de la resistencia bacteriana, principal consecuencia de la contaminación por antibióticos del ecosistema.

Según Graham et al. (2016), la alta cantidad de residuos de antibióticos en el medio ambiente, como el suelo y el agua, acelera la capacidad de las bacterias para crear genes de resistencia. Si se reduce la cantidad de antibióticos en el medio ambiente se reduce la resistencia bacteriana.

Al generar una reducción de la concentración de un producto contaminado, como por ejemplo la leche con residuos de OTC, existe menor probabilidad de que el antibiótico vaya a finalizar su recorrido en las raíces de algún vegetal que pueda absorberlo y contaminarse (Hu et al., 2010).

Según Tempini et al. (2018), una forma de evitar la contaminación del ambiente con residuos de antibióticos presentes en leche consiste en alimentar a animales de granja con esta leche. Sin embargo, se recomienda degradar los antibióticos antes de proceder de esa manera puesto que el antibiótico puede verse presente en las heces del animal.

Entonces, al momento de degradar OTC en leche se mitiga la contaminación del ambiente, porque se reduce la cantidad que puede estar libremente expuesta en el suelo y en el agua.

#### ***4.8.1 Legislación Ambiental***

Los contaminantes emergentes incluyen un amplio grupo de compuestos químicos, como por ejemplo los medicamentos. El conocimiento limitado de su impacto sobre el medio ambiente ocasiona que estos contaminantes carezcan de normas regulatorias que señalen límites permisibles para que no produzcan daño a los seres vivos (Muñoz, 2017).

El descubrimiento de nuevas implicaciones en la contaminación del suelo y del agua despierta la creciente necesidad de disponer de una legislación que garantice la seguridad del ecosistema en el que nos desarrollamos (Muñoz, 2017).

A medida que se siga conociendo su comportamiento en la naturaleza y en la salud de los seres que subsisten en ella, pueda ser que se elabore una regulación que hasta el momento no existe (Gil et al., 2012).

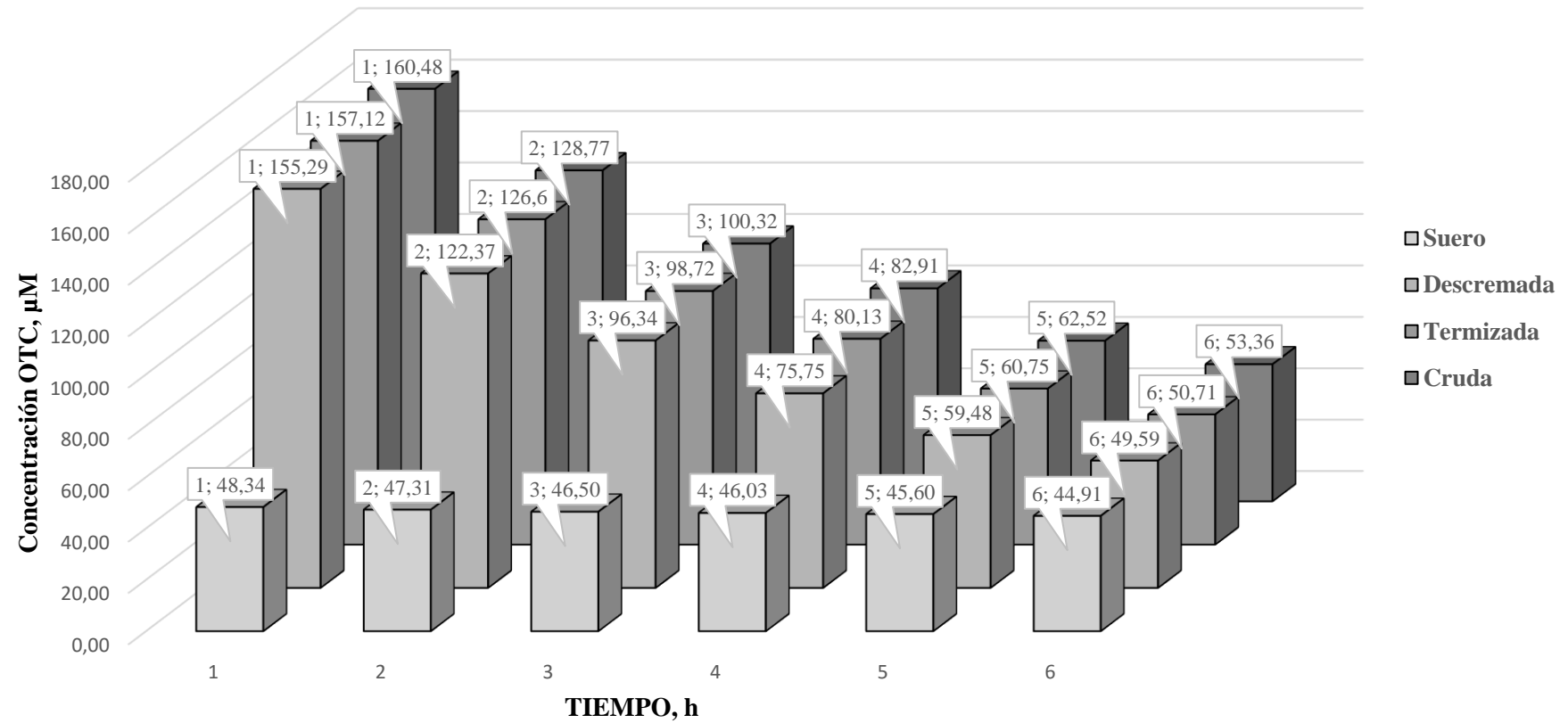
La única normativa que arroja límites de referencia para contaminantes emergentes es la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos o EPA por sus siglas en inglés.

Sin embargo, la legislación por el momento sólo hace referencia a ciertos contaminantes emergentes que incluyen medicamentos y otros compuestos tales como diclofenaco, carbamazepina y triclosán.

#### **4.9 Relación pretratamiento y tiempo de degradación de OTC a una concentración de lacasa baja, media y alta**

En los Gráficos 5-4, 6-4 y 7-4 se observan que las muestras de leche con pretratamiento y sin pretratamiento están agrupadas en función de cada una de las tres concentraciones de lacasa para evidenciar la efectividad de los pretratamientos en la degradación de la oxitetraciclina.

Desde el tiempo 1 la concentración de OTC en el suero descendió a más de la mitad de la concentración inoculada inicialmente, esto fue debido al reparto del antibiótico a las otras fracciones de la leche. A lo largo del tiempo la concentración de OTC en suero no disminuyó significativamente con las concentraciones baja, media y alta de lacasa. El efecto de la lacasa para disminuir OTC en suero fue poco efectivo.



**Gráfico 5-4:** Concentración de oxitetraciclina (OTC) a través del tiempo luego de haber empleado pretratamientos a una concentración de lacasa baja.

Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.

En el caso del pretratamiento térmico y descremado de la leche el efecto en la reducción de OTC es poco significativo si se compara con la leche cruda sin pretratamiento, a las concentraciones baja, media y alta de enzima.

Sin embargo, sucedió que al tiempo 1, a una concentración baja de lacasa el pretratamiento de descremación láctea disminuyó más la concentración de OTC en comparación al pretratamiento térmico de la leche.

A una concentración media de lacasa y al tiempo 1 de estudio, el mayor descenso de oxitetraciclina después del suero, ocurrió en la leche sin pretratamiento, luego ocurrió en la leche descremada y con pretratamiento térmico, ambas muestras sin diferencia estadística significativa.

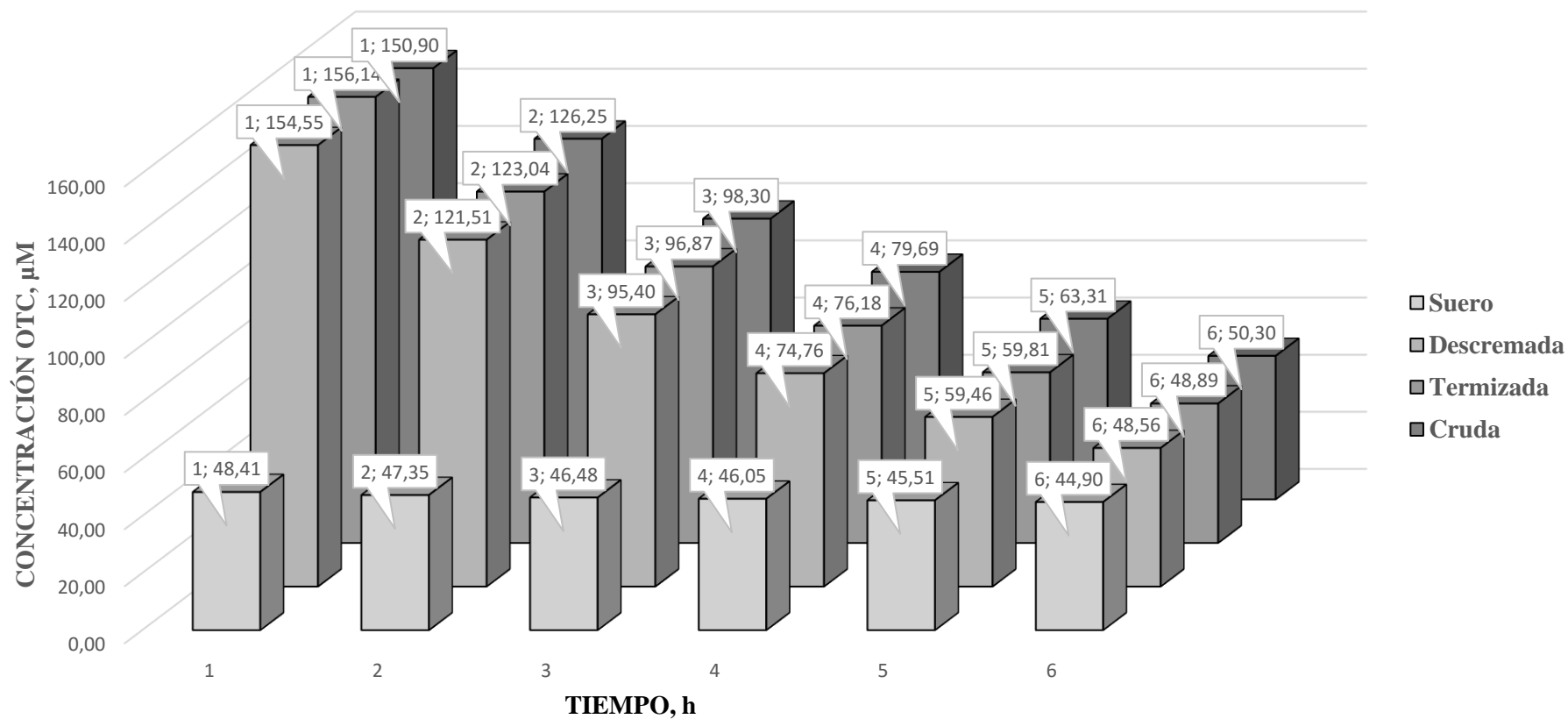
En cuanto a la concentración alta de lacasa, hubo diferencia estadística significativa entre todas las muestras, siendo el orden de efectividad degradativa después de la muestra de suero, el siguiente: sin pretratamiento, descremado y pretratamiento térmico.

Al tiempo 2 se detectó diferencia estadística significativa entre todos los pretratamientos para degradar oxitetraciclina, a una concentración baja y media de lacasa. En primer lugar, las muestras de suero tuvieron los valores más bajos, a continuación, las muestras de leche descremada, después las muestras de leche pretratadas térmicamente y finalmente, las muestras sin pretratamiento.

En cuanto al tiempo 2 y a una concentración alta de lacasa, la mayor degradación de oxitetraciclina sucedió en la muestra de suero, a continuación, la muestra de leche descremada y con pretratamiento térmico, sin que exista diferencia estadística significativa entre estas últimas. Al final, la muestra de leche sin pretratamiento registró el valor más alto.

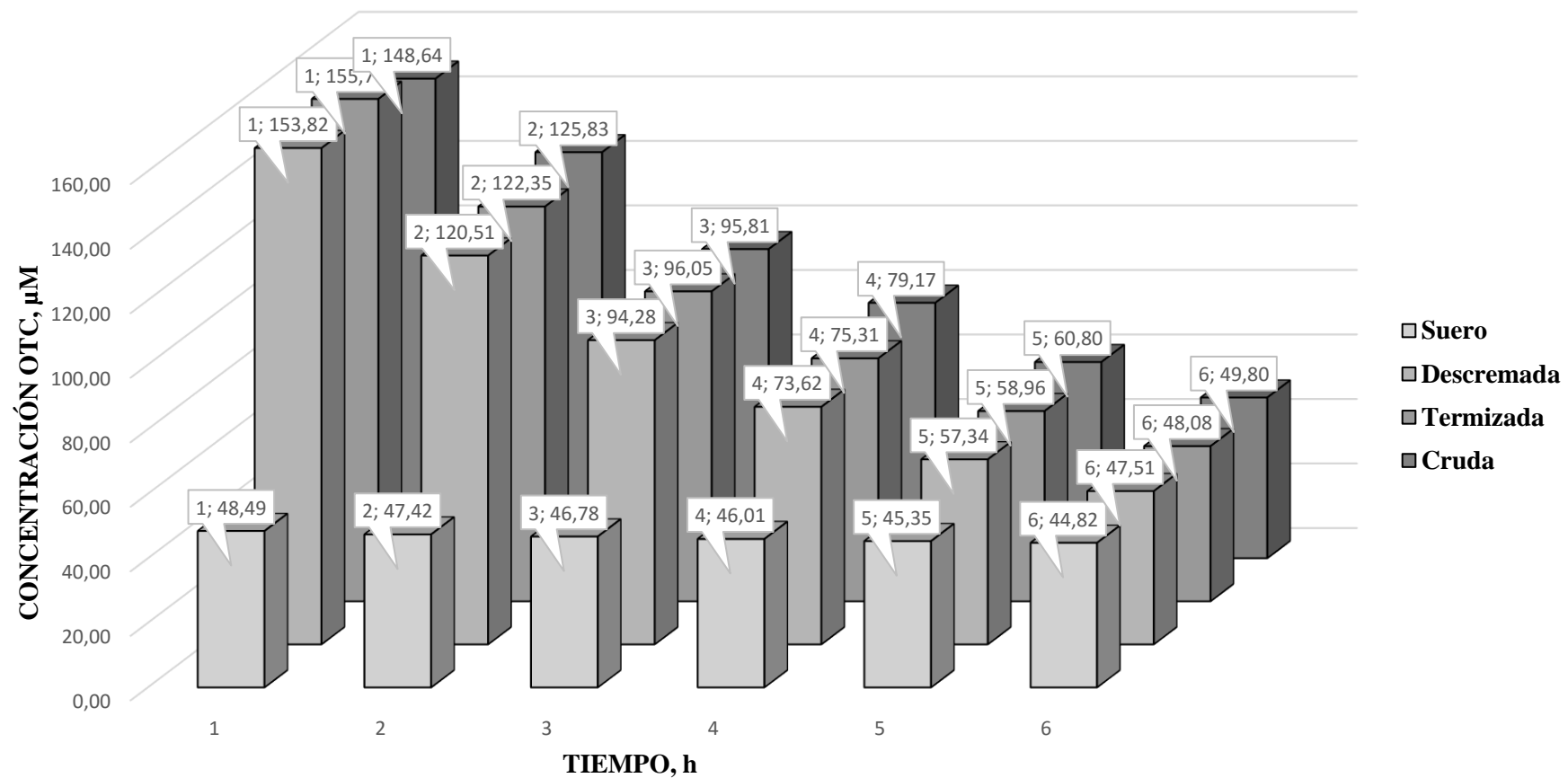
Al tiempo 3 y a una concentración baja de lacasa se registró diferencia estadística significativa entre todas las muestras, el suero tuvo el valor de concentración más bajo de oxitetraciclina, luego la leche descremada, la leche pretratada con calor y al final la leche sin pretratamiento.

Cuando se aplicó una concentración media y alta, los valores de oxitetraciclina en suero fueron los más bajos. En las muestras con una concentración media de lacasa no hubo diferencia estadística significativa entre la muestra de leche descremada y la muestra sometida a pretratamiento térmico. La leche sin pretratamiento tuvo el valor más alto, pero no tuvo diferencia estadística significativa con el valor de la muestra de leche pretratada térmicamente. Con una concentración alta de lacasa la muestra que menor concentración de oxitetraciclina tuvo, después



**Gráfico 6-4:** Concentración de oxitetraciclina (OTC) a través del tiempo luego de haber empleado pretratamientos a una concentración de lacasa media.

Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.



**Gráfico 7-4:** Concentración de oxitetraciclina (OTC) a través del tiempo luego de haber empleado pretratamientos a una concentración de lacasa alta.

Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.

del suero, fue la sometida a descremación. Finalmente, las muestras sin pretratamiento y con pretratamiento térmico tuvieron valores, carentes de diferencia estadística significativa.

Al tiempo 4 y tiempo 5, ocurrió un comportamiento similar. Hubo diferencia estadística significativa entre todas las muestras con concentraciones baja y alta de lacasa.

El suero tuvo los valores más bajos de concentración de OTC. Los valores más bajos de OTC recayeron luego en la leche descremada. Después, los valores más bajos fueron para la leche pretratada térmicamente y finalmente la leche cruda presentó los niveles más altos de antibiótico.

Bajo una concentración media de lacasa, al tiempo 4 y tiempo 5, los niveles bajos de oxitetraciclina sucedieron en el suero. Tanto para el tiempo 4 como para el tiempo 5 no hubo diferencia estadística significativa entre el pretratamiento de leche descremada y el pretratamiento térmico. Finalmente, los niveles más altos de oxitetraciclina fueron para la leche sin pretratamiento.

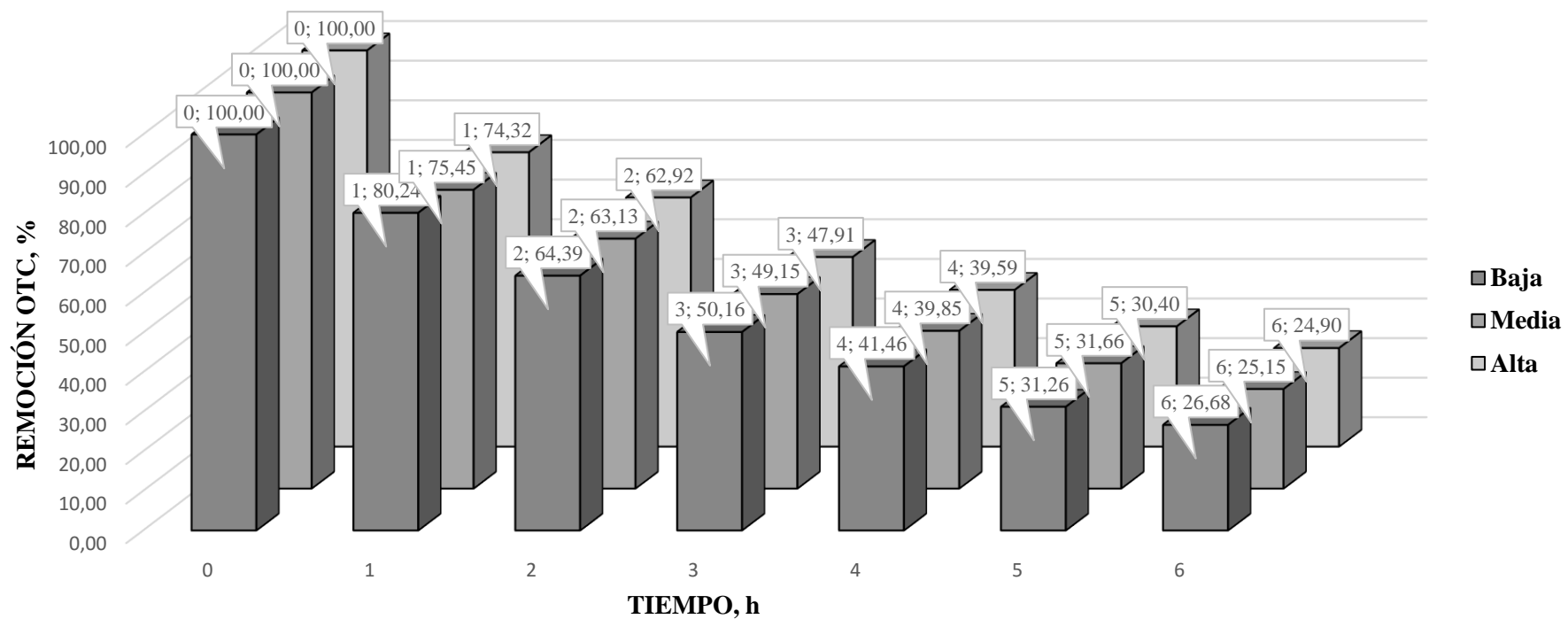
Al tiempo 6 y con concentraciones baja y media de lacasa, los niveles más bajos de oxitetraciclina estuvieron en el suero. Los valores más bajos registraron luego, las muestras con pretratamiento de descremación y pretratamiento térmico, sin que exista diferencia estadística significativa entre estos. Las muestras de leche sin pretratamiento ocuparon el último lugar.

Cuando se usó una concentración alta de lacasa se detectó diferencia estadística significativa entre todos los pretratamientos. El orden de menor a mayor concentración fue el siguiente: el suero tuvo la concentración de oxitetraciclina más pequeña, luego la leche descremada y por último la leche con pretratamiento térmico y la leche sin ningún pretratamiento.

#### **4.10 Porcentaje de permanencia de oxitetraciclina a través del tiempo en leche cruda sin pretratamiento, con pretratamiento térmico, descremación y suero**

En la leche cruda se puede observar que la concentración de OTC removida oscila entre el 20% y 25% a la primera hora de ensayo, después de haber utilizado concentraciones de lacasa baja, media y alta.

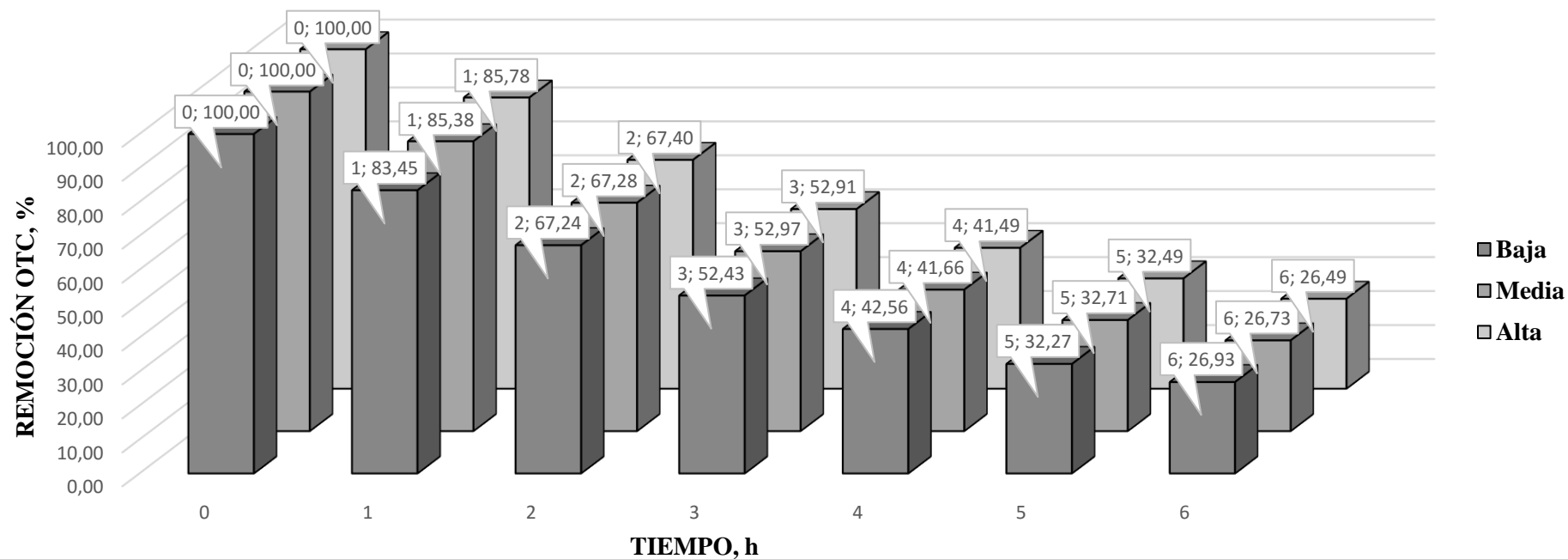
En la leche pretratada térmicamente, el nivel de reducción de OTC fue del 15% aproximadamente, en la leche descremada fue cerca del 23%, mientras que en el caso del suero la disminución de OTC no llegó al 2%.



**Gráfico 8-4:** Porcentaje de oxitetraciclina (OTC) remanente en leche cruda sin pretratamiento, a través del tiempo luego de haber empleado concentraciones de lacasa baja, media y alta.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.





**Gráfico 9-4:** Porcentaje de oxitetraciclina (OTC) remanente de leche termizada, a través del tiempo luego de haber empleado concentraciones de lacasa baja, media y alta.

Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.

En la segunda hora, la reducción del nivel de OTC en leche cruda representó el 37%, en la leche pretratada con calor fue 33%, en la descremada resultó aproximadamente 39% y en el suero fue menos del 4%.

A la tercera hora, en la leche cruda el nivel de OTC se redujo hasta cerca de la mitad, en la leche pretratada térmicamente se removió un 48%, en la leche descremada el nivel de antibiótico degradado fue cerca del 52% y en el suero el porcentaje removido fue 5,5% aproximadamente.

Durante la cuarta hora, aproximadamente el 60% de OTC fue eliminado de la leche cruda, un 58% se eliminó de la leche pretratada térmicamente, el 63% se degradó en la leche descremada y el 7 % en suero.

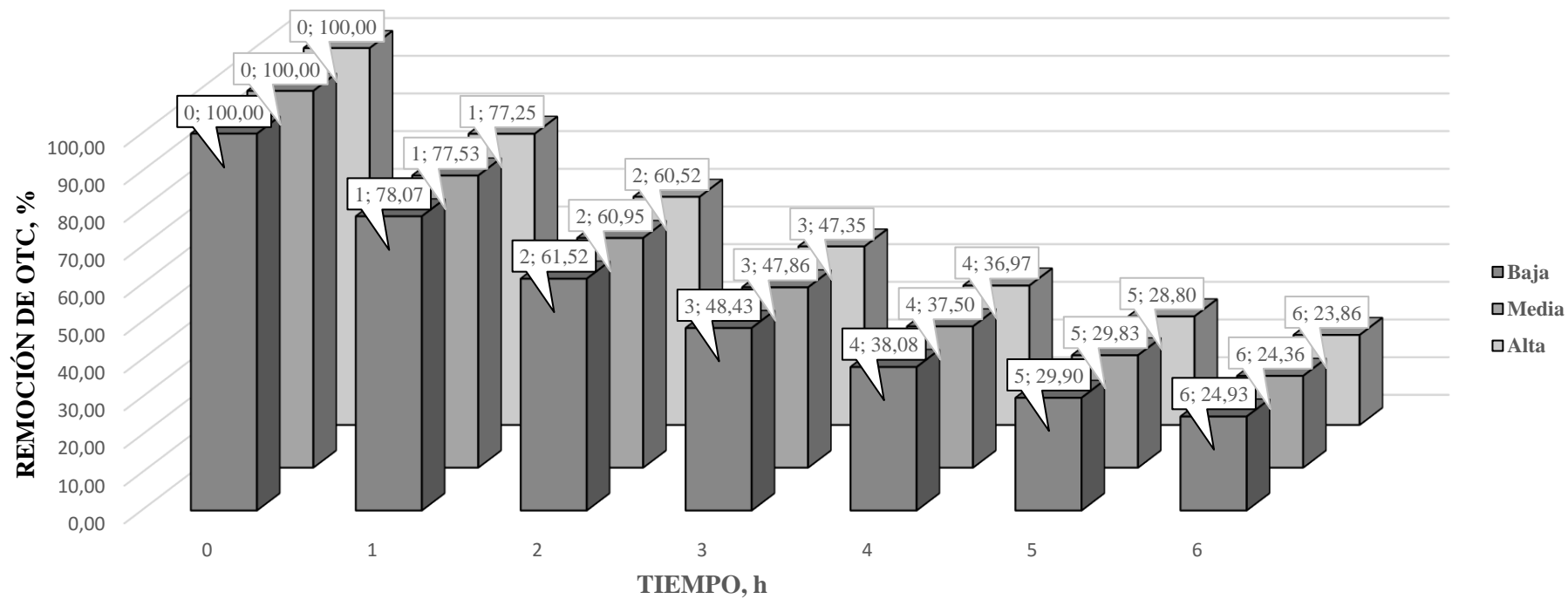
En el transcurso de la quinta hora, en la leche cruda, la OTC se degradó en un 69%, en la leche sometida al pretratamiento térmico se degradó el 68% del antibiótico, el 71% se degradó en la fracción descremada de la leche y alrededor del 8% en suero.

Finalmente, al término de las 6 horas la OTC presente en la leche cruda se degradó en un 75% aproximadamente, un 74% de antibiótico se removió de la leche pretratada térmicamente, el 76% de OTC disminuyó en la leche descremada y el 9% en suero.

En resumen, se puede apreciar que los pretratamientos, térmico y de descremado, no contribuyeron sustancialmente en la efectividad degradativa de la enzima, exceptuando el suero, donde la OTC se distribuyó en menor proporción.

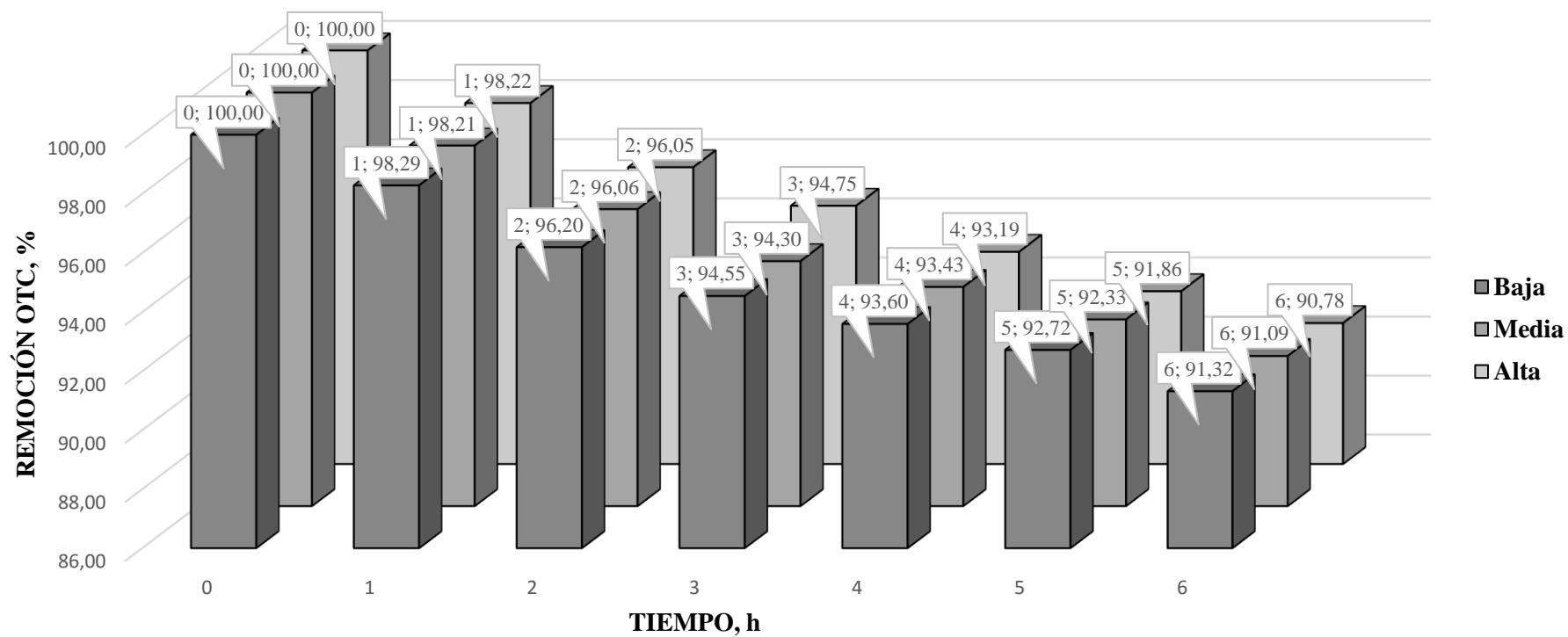
Mientras tanto, la lacasa no fue tan efectiva en el suero, pero lo fue en la leche sin pretratamiento y con pretratamiento. Al aumentar la cantidad de lacasa hubo un mínimo incremento en la degradación de OTC. En conclusión, más cantidad de enzima y mayor tiempo de contacto con la lacasa más OTC se degradó.

En el apartado de la cinética de degradación de OTC en leche y suero se podrá apreciar de mejor manera el comportamiento entre concentraciones de lacasa, revelado por la constante cinética de degradación. Además, se verá como el suero no se ajusta a una degradación semejante a la evidenciada en la leche cruda y los pretratamientos, térmico y de descremado de la leche.



**Gráfico 10-4:** Porcentaje de oxitetraciclina (OTC) remanente de leche descremada, a través del tiempo luego de haber empleado concentraciones de lacasa baja, media y alta.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.



**Gráfico 11-4:** Porcentaje de oxitetraciclina (OTC) remanente de suero, a través del tiempo luego de haber empleado concentraciones de lacasa baja, media y alta.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

#### 4.11 Cinética de degradación y proyección de la degradación de OTC a partir de la séptima hora

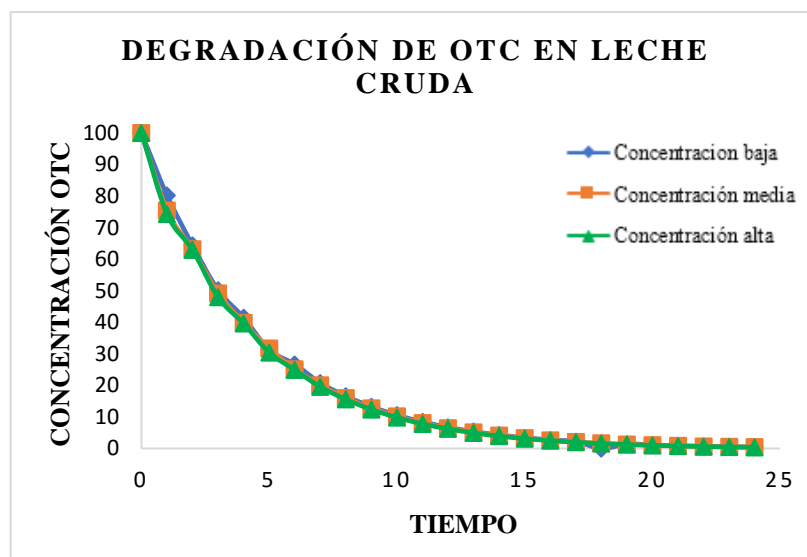
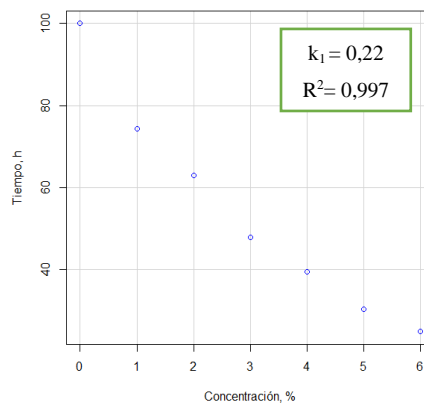
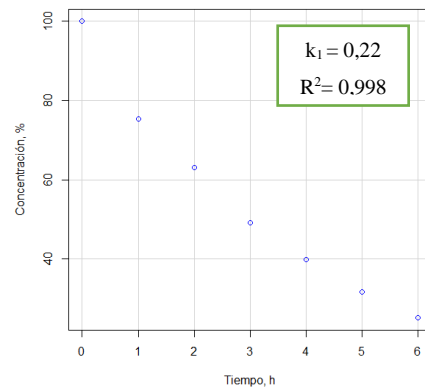
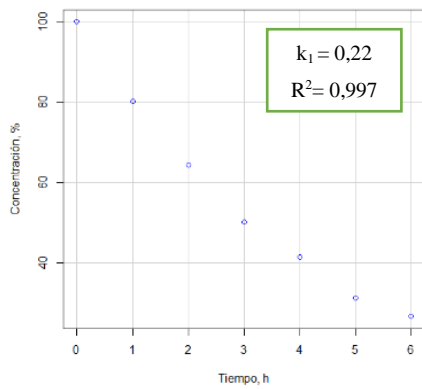
La cinética de primer orden se ajusta a la ecuación  $\ln [A] = \ln [A_0] - k_1 t$  que también puede expresarse como  $[A] = [A_0]e^{-k_1 t}$ . La degradación de OTC en leche cruda se ajusta a la cinética de primer orden. También se pudo predecir un probable tiempo de degradación total de la OTC, después de las 6 horas de análisis, el mismo que se muestra en la Tabla 4-4 junto al coeficiente de correlación de Pearson (r) y la ecuación cinética, para la leche cruda a las tres concentraciones de lacasa ensayadas.

**Tabla 4-4:** Estimación de la degradación de OTC en leche después de la sexta hora, empleando una concentración baja, media y alta de lacasa en leche cruda.

	Concentración baja	Concentración media	Concentración alta
<b>Ecuación</b>	$C=100,0312\exp^{-0,224620t}$	$C=97,89309\exp^{-0,226352t}$	$C=97,36336\exp^{-0,22936t}$
<b>r</b>	0,998	0,998	0,998
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>
7	20,76	20,07	19,54
8	16,58	16,00	15,54
9	13,24	12,76	12,35
10	10,58	10,17	9,82
11	8,45	8,11	7,81
12	6,75	6,47	6,20
13	5,39	5,16	4,93
14	4,30	4,11	3,92
15	3,44	3,28	3,12
16	2,74	2,61	2,48
17	2,19	2,08	1,97
18	1,75	1,66	1,56
19	1,40	1,32	1,24
20	1,11	1,05	0,99
21	0,89	0,84	0,78
22	0,71	0,67	0,62
23	0,57	0,53	0,49
24	0,45	0,42	0,39

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

A partir de la ecuación encontrada se pudo establecer la constante cinética  $k_1$  que corresponde a la pendiente con un coeficiente de determinación  $R^2$  próximo a la unidad como se muestra en la Figura 3-4.



**Figura 3-4:** Curvas de degradación de OTC durante las 6 primeras horas y durante 24 horas a concentraciones de lacasa baja, alta y media en leche cruda.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

La Tabla 5-4 muestra la predicción de la degradación de OTC a partir de la séptima hora para la leche pretratada térmicamente. También se puede apreciar la Figura 4-4, las curvas obedecen a la cinética de degradación de primer orden, coeficientes de determinación y constantes cinéticas.

**Tabla 5-4:** Estimación de la degradación de OTC en leche después de la sexta hora, empleando una concentración baja, media y alta de lacasa en leche tratada térmicamente.

	Concentración baja	Concentración media	Concentración alta
<b>Ecuación</b>	$C=102,8879\exp^{-0,224763t}$	$C=103,8574\exp^{-0,227012t}$	$C=104,2632\exp^{-0,229004t}$
<b>R</b>	0,998	0,998	0,998
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>
7	21,33	21,19	20,98
8	17,03	16,89	16,69
9	13,60	13,46	13,27
10	10,87	10,72	10,55
11	8,68	8,54	8,39
12	6,93	6,81	6,67
13	5,53	5,42	5,31
14	4,42	4,32	4,22
15	3,53	3,44	3,35
16	2,82	2,74	2,67
17	2,25	2,18	2,12
18	1,80	1,74	1,69
19	1,43	1,39	1,34
20	1,14	1,10	1,06
21	0,91	0,88	0,85
22	0,73	0,70	0,67
23	0,58	0,56	0,53
24	0,46	0,44	0,42

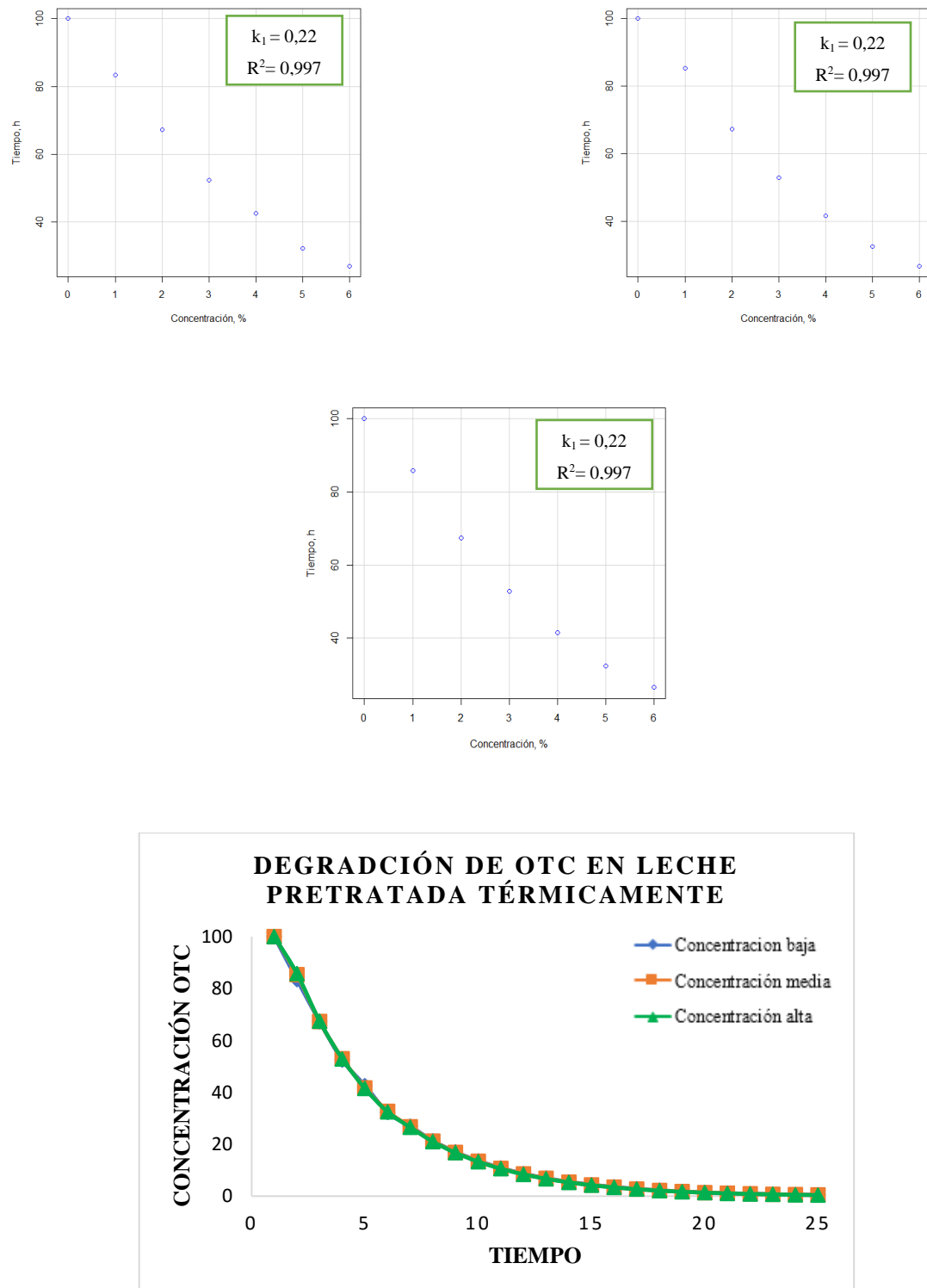
Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.

La Tabla 6-4 muestra la predicción de la degradación de OTC a partir de la séptima hora para la leche descremada. También se puede apreciar la Figura 5-4, las curvas obedecen a la cinética de degradación de primer orden, coeficientes de determinación y constantes cinéticas.

La Tabla 7-4 muestra la predicción de la degradación de OTC a partir de la séptima hora para la el suero. También se puede apreciar la Figura 6-4, las curvas obedecen a la cinética de degradación de primer orden, coeficientes de determinación y constantes cinéticas.

Al observar las diferentes constantes cinéticas de degradación se puede observar que menor valor poseen corresponden a la lacasa actuando en suero.

Mientras tanto, la lacasa en leche descremada tuvo un ligero aumento en sus constantes cinéticas de degradación.



**Figura 4-4:** Curvas de degradación de OTC durante las 6 primeras horas y durante 24 horas a concentraciones de lacasa baja, media y alta en leche pretratada térmicamente.

Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.



**Tabla 6-4:** Estimación de la degradación de OTC en leche después de la sexta hora, empleando una concentración baja, media y alta de lacasa en leche tratada descremada.

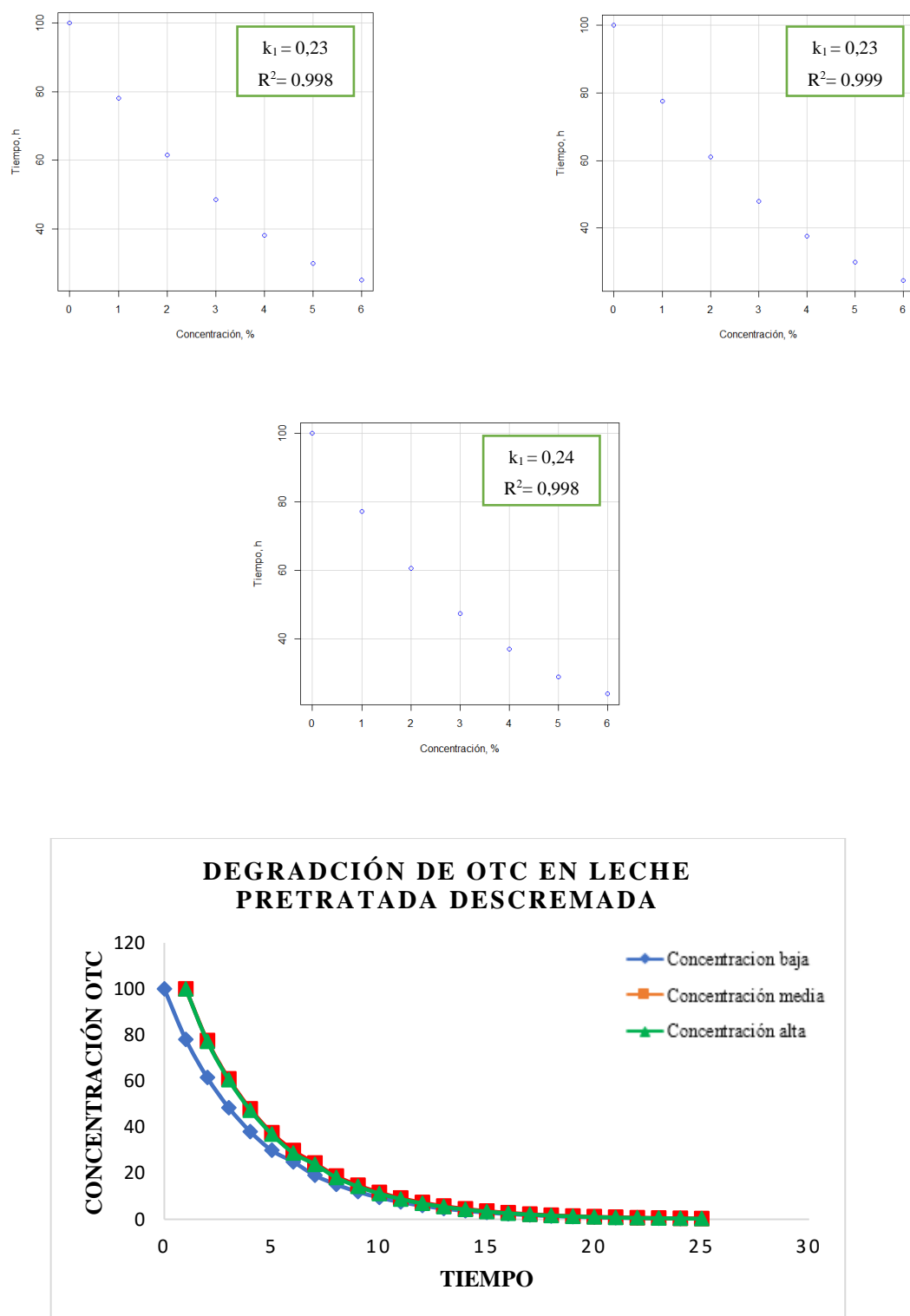
	Concentración baja	Concentración media	Concentración alta
<b>Ecuación</b>	$C = 98,64544 \exp^{-0,234517t}$	$C = 98,37473 \exp^{-0,236882t}$	$C = 98,48429 \exp^{-0,241611t}$
<b>R</b>	0,999	0,999	0,999
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>
7	19,10	18,73	18,14
8	15,11	14,78	14,25
9	11,95	11,66	11,19
10	9,45	9,20	8,79
11	7,47	7,26	6,90
12	5,91	5,73	5,42
13	4,67	4,52	4,25
14	3,69	3,56	3,34
15	2,92	2,81	2,62
16	2,31	2,22	2,06
17	1,83	1,75	1,62
18	1,44	1,38	1,27
19	1,14	1,09	0,99
20	0,90	0,86	0,78
21	0,71	0,67	0,61
22	0,56	0,53	0,48
23	0,44	0,42	0,38
24	0,35	0,33	0,29

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

Las constantes cinéticas de degradación  $k_1$ , con valores más altos fueron aquellas que pertenecieron a la concentración más alta de lacasa, fenómeno que ocurrió tanto para la leche con y sin pretratamiento, que resulta lógico porque al aumentar la concentración de enzima actúa con más moléculas de sustrato y por consiguiente, la reacción aumenta la velocidad y degrada más moléculas de sustrato

Por lo tanto, la enzima lacasa provocó un descenso en la concentración de oxitetraciclina de la leche, a través del tiempo, en cada una de las muestras: leche entera, leche pretratada térmicamente, leche descremada y lactosuero. Sin embargo, la mayor rapidez en la degradación del antibiótico ocurre en la leche descremada; ya que, presenta una constante cinética de degradación  $k_1 = 0,241 \text{ h}^{-1}$ .

Puede observarse que las constantes cinéticas de primer orden  $k_1$ , en las tres curvas de degradación, varían su valor a partir del tercer decimal (ver en la fórmula) y esto se debió al cambio de concentración enzimática que desencadenó una leve aceleración en la reacción de degradación.



**Figura 5-4:** Curvas de degradación de OTC durante las 6 primeras horas y durante 24 horas a concentraciones de lacasa baja, media y alta en leche descremada.

**Realizado por:** Paz León, Jefferson. 2019.

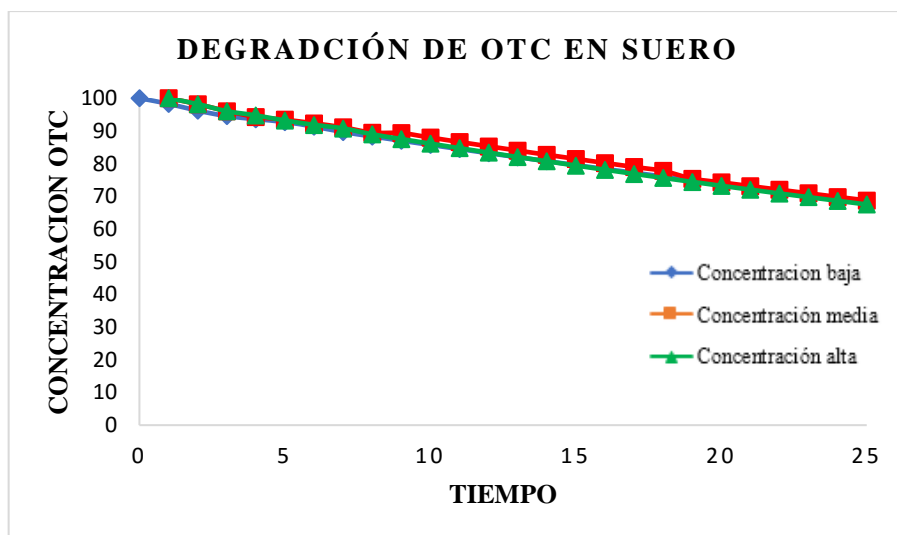
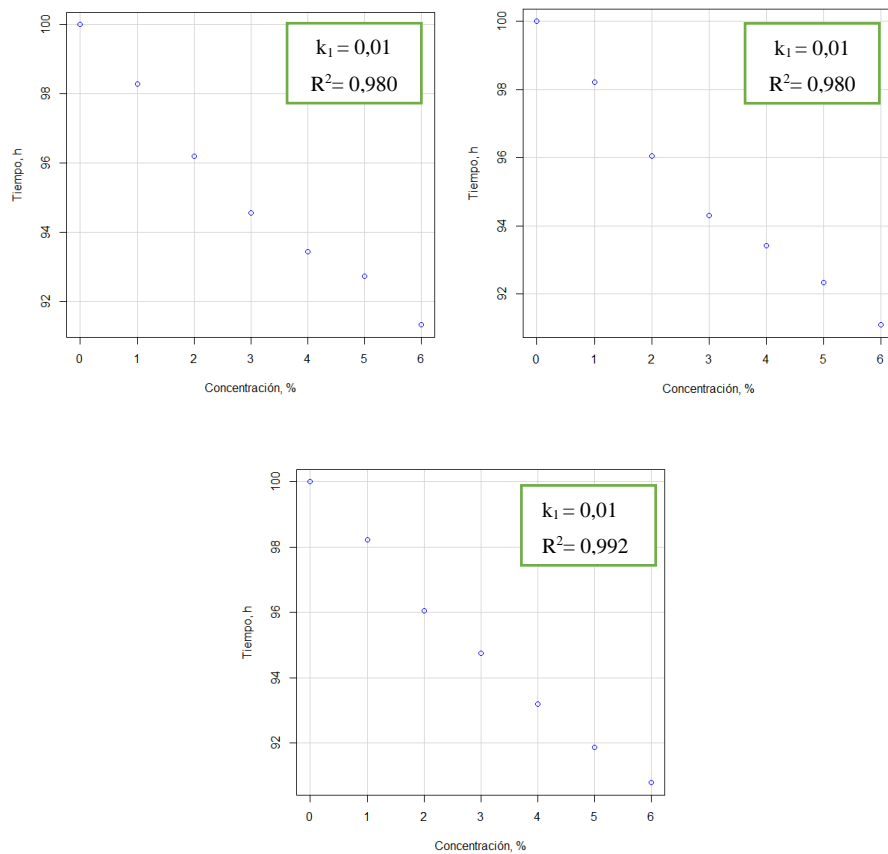
**Tabla 7-4:** Estimación de la degradación de OTC en leche después de la sexta hora, empleando una concentración baja, media y alta de lacasa en suero.

	Concentración baja	Concentración media	Concentración alta
<b>Ecuación</b>	$C = 99,53461 \exp^{-0,0149391t}$	$C = 99,50657 \exp^{-0,0154002t}$	$C = 99,6631 \exp^{-0,0162254t}$
<b>R</b>	0,989	0,990	0,996
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>	<b>Concentración Estimada (%)</b>
7	89,65	89,50	88,96
8	88,32	89,33	87,53
9	87,01	87,97	86,12
10	85,72	86,62	84,73
11	84,45	85,30	83,37
12	83,19	84,00	82,03
13	81,96	82,71	80,71
14	80,75	81,45	79,41
15	79,55	80,20	78,13
16	78,37	78,98	76,87
17	77,21	77,77	75,63
18	76,06	75,41	74,42
19	74,93	74,26	73,22
20	73,82	73,12	72,04
21	72,73	72,01	70,88
22	71,65	70,91	69,74
23	70,59	69,82	68,62
24	69,54	68,75	67,51

Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.

El incremento del valor de  $k_1$  es pequeño con respecto al incremento de la concentración de enzima lacasa, este fenómeno ocurre tanto en la leche entera cruda sin pretratamiento y con pretratamientos de temperatura y fraccionamiento.

Para deducir la primera ecuación de cada una de las figuras, donde se muestra la curva de degradación, primero se transforma la concentración a una escala logarítmica de acuerdo a la ecuación de cinética de primer orden y se aplica un modelo lineal entre la escala logarítmica de la concentración y el tiempo, de manera que el coeficiente de determinación  $R^2$  deberá revelar si la escala logarítmica de la concentración es lineal con respecto al tiempo, mientras el valor sea más próximo a 1, la ecuación explicará mejor el modelo que siguen los datos obtenidos para la construcción de la gráfica, que corresponde a la ecuación cinética de primer orden, como se muestra en la segunda ecuación de cada una de las figuras, entonces se puede ver que la tercera ecuación se presenta idéntica a la segunda, sólo que reemplazada con los datos correspondientes a cada curva de degradación.



**Figura 6-4:** Curvas de degradación de OTC durante las 6 primeras horas y durante 24 horas a concentraciones de lacasa baja, media y alta en suero.

Realizado por: Paz León, Jefferson. 2019.

## CONCLUSIONES

- Se evaluó como efecto positivo la degradación de oxitetraciclina en leche o suero gracias a la acción de la lacasa en todas sus concentraciones tras las 6 horas de ensayo o por el pretratamiento desuerado sin adición de lacasa, consiguiéndose una máxima remoción de aproximadamente el 75%. Con esto se consigue residuos del antibiótico por debajo del LMR establecido por el Codex Alimentarius, de manera que la concentración residual del antibiótico en la leche, después de este estudio, puede incidir en la reducción del riesgo de contaminación del suelo o el agua
- Los pretratamientos térmico y descremado no disminuyen sustancialmente la presencia de OTC en la leche, mientras que el desuerado resulta en un suero con una reducción de más del 75% la concentración del antibiótico, de manera que puede ser reutilizado en lugar de ser descartado al suelo o agua.
- Usar el doble o triple la concentración de lacasa a lo largo de las 6 horas de estudio no aumenta la velocidad de degradación de la OTC en las muestras de leche o suero.
- Los pretratamientos térmico y descremado de la leche no favorecen la degradación de la OTC por parte de la lacasa, en comparación con la leche cruda. Así mismo, la lacasa, en cualquiera sus concentraciones, reduce muy levemente la concentración de OTC en el suero.
- A medida que transcurrió el tiempo de análisis establecido, la concentración de oxitetraciclina en leche disminuyó con el incremento de la concentración de enzima lacasa.

## RECOMENDACIONES

- Se podría utilizar el método de acidificación para obtener el suero, el cual presenta niveles de OTC lo suficientemente bajos como para reutilizarlo para consumo humano o animal, sin necesidad de aplicar la lacasa.
- Con el proceso de descremado de leche con residuos de OTC se puede obtener una crema prácticamente libre de este antibiótico, lo cual puede ser también reutilizado en la industria láctea.
- El ganadero o productor de leche también podría aplicar simplemente la lacasa en leche sin necesidad de pretratar con calor o descremar, y en tan solo 3 horas, la concentración de OTC queda por debajo del LMR establecido por el Codex Alimentarius para considerarse como alimento inocuo para consumo humano o animal.
- Se debería tomar como punto de partida el presente trabajo de titulación para estudios de tratamientos biológicos, amigables con el medio ambiente, de degradación de múltiples compuestos recalcitrantes que son resultado de procesos de las industrias manufactureras.
- En estudios complementarios a la presente investigación, se podría identificar cuáles son los subproductos resultantes de la degradación de oxitetraciclina, con el objeto de establecer su peligrosidad con el medio ambiente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada Rudolph, R. E. (2016). *Degradación de antibióticos utilizados en la salmonicultura mediante el uso de hongos marinos* (Tesis doctoral, Universidad de Concepción (Chile), Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile).
- Ahern, B., & Richardson, D. (2006). Surgical site infection and the use of antimicrobials. *Equine Surg 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier*, 70-87.
- Allison, J. (1985). Antibiotic residues in milk. *British Veterinary Journal*, 141(1), 9-16.
- Alsager, O., Alnajrani, M., Abuelizz, H., & Aldaghmani, I. (2018). Removal of antibiotics from water and waste milk by ozonation: kinetics, byproducts, and antimicrobial activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 114-122.
- Batt, A., Bruce, I., & Aga, D. (2006). Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environmental Pollution*, 142(2), 295-302.
- Becker, D., Varela Della Giustina, S., Rodriguez-Mozaz, S., Schoevaart, R., Barceló, D., & de Cazes, M. et al. (2016). Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase – Degradation of compounds does not always eliminate toxicity. *Bioresource Technology*, 219, 500-509.
- Betancur Restrepo, L. M. (2016). *Describir la frecuencia de presentación de mastitis por medio de California Mastitis Test en bovinos de leche de la finca El Pantano en Belmira-Antioquia entre Junio y Noviembre de 2015* (Tesis doctoral, Corporación Universitaria Lasallista).
- Cabizza, R., Rubattu, N., Salis, S., Pes, M., Comunian, R., & Paba, A. et al. (2018). Impact of a thermisation treatment on oxytetracycline spiked ovine milk: Fate of the molecule and technological implications. *LWT*, 96, 236-243.
- Cabizza, R., Rubattu, N., Salis, S., Pes, M., Comunian, R., & Paba, A. et al. (2017). Transfer of oxytetracycline from ovine spiked milk to whey and cheese. *International Dairy Journal*, 70, 12-17.

- Charm, S. E. (1980). *U.S. Patent No. 4,238,521*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Codex Alimentarius. (2015). *Límites Máximos de Residuos (LMR) y recomendaciones sobre la Gestión de Riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. CAC/MRL 2-2015. Actualizado en la 38.<sup>a</sup> Sesión de la Comisión del Codex Alimentarius (julio de 2015)*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Cruz Barrazueta, L. E. (2009). *Eficiencia reproductiva de vacas Holstein con metritis tratadas con cefalosporinas y oxitetraciclina* (Tesis de grado, Quito: USFQ).
- Díaz Peñafiel, C. A. (2012). *Determinación de Residuos de Antibióticos y sulfanamidas en seis Marcas comerciales de Leche de Mayor Consumo en la Ciudad de Riobamba* (Tesis de grado, Riobamba: ESPOCH).
- Ding, H., Wu, Y., Zou, B., Lou, Q., Zhang, W., & Zhong, J. et al. (2016). Simultaneous removal and degradation characteristics of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics by laccase-mediated oxidation coupled with soil adsorption. *Journal of Hazardous Materials*, 307, 350-358.
- Ergun, S. O., & Urek, R. O. (2017). Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science*, 15(2), 273-277.
- Fletouris, D., Papapanagiotou, E., & Nakos, D. (2008). Liquid chromatographic determination and depletion profile of oxytetracycline in milk after repeated intramuscular administration in sheep. *Journal of Chromatography B*, 876(1), 148-152.
- Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción+ limpia*, 7(2).
- Graham, D. W., Knapp, C. W., Christensen, B. T., McCluskey, S., & Dolfing, J. (2016). Appearance of  $\beta$ -lactam Resistance Genes in Agricultural Soils and Clinical Isolates over the 20 th Century. *Scientific reports*, 6, 21550.
- Gómez, M. (Julio de 2017). Validación de métodos de cribado para la detección de antibióticos en lactosuero de cabra. Valencia, España.



- Hakk, H., Shappell, N., & Lupton, S. (2016). Distribution of animal drugs between skim milk and milk fat fractions in spiked whole milk: understanding the potential impact on commercial milk products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1-10.
- Hernández-Rojas, M., & Vélez-Ruiz, J. F. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 8(2), 13-22.
- Homem, V., & Santos, L. (2011). Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices—a review. *Journal of environmental management*, 92(10), 2304-2347.
- Jeon, M., Kim, J., Paeng, K. J., Park, S. W., & Paeng, I. R. (2008). Biotin–avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. *Microchemical Journal*, 88(1), 26-31.
- Jia, J., Zhang, S., Wang, P., & Wang, H. (2012). Degradation of high concentration 2,4-dichlorophenol by simultaneous photocatalytic–enzymatic process using TiO<sub>2</sub>/UV and laccase. *Journal of Hazardous Materials*, 205-206, 150-155.
- Jiménez, A. (2003). *Diseño de procesos en ingeniería química*. Reverté.
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological indicators*, 8(1), 1-13.
- Kitazono, Y., Ihara, I., Yoshida, G., Toyoda, K., & Umetsu, K. (2012). Selective degradation of tetracycline antibiotics present in raw milk by electrochemical method. *Journal of hazardous materials*, 243, 112-116.
- León Cadena, V. E. (2013). *Validación del método artesanal propuesto por José Ducbach, para la detección de diferentes tipos de antibióticos en leche de fincas ganaderas de los Cantones Cayambe y Pedro Moncayo* (Tesis de grado, Quito: UPS).
- Lindmark-Månsson, H., & Åkesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk. *British journal of Nutrition*, 84(S1), 103-110.
- Margot, J., Maillard, J., Rossi, L., Barry, D. A., & Holliger, C. (2013). Influence of treatment conditions on the oxidation of micropollutants by *Trametes versicolor* laccase. *New biotechnology*, 30(6), 803-813.

- Martínez-Costa, J. I., Rivera-Utrilla, J., Leyva-Ramos, R., Sánchez-Polo, M., & Velo-Gala, I. (2018). Individual and simultaneous degradation of antibiotics sulfamethoxazole and trimethoprim by UV and solar radiation in aqueous solution using bentonite and vermiculite as photocatalysts. *Applied Clay Science*, 160, 217-225.
- Mata, G., Salmenes, D., & Savole, J. (2017). Las enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus* spp. En S. José, & R. Daniel, La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp (págs. 68-75). Chiapas: ECOSUR.
- Muñoz Arranz, A. (2017). *Antibióticos en el suelo* (Trabajo de grado, Madrid: Universidad Complutense).
- Ortiz Alvarado, M. (2014). *Detección de la presencia de Aflatoxina M1 y Antibióticos en leche cruda de las fincas de mayor producción del cantón Biblián* (Tesis de magíster, Cuenca: Universidad del Azuay).
- Ortíz, M., Rosales Jaramillo, C. A., Aguilar Valladares, Y. M., Murillo Apolo, Y. A., Serpa García, V. G., Paguay, T., & Coronel, A. G. (2017). Estudio exploratorio sobre la presencia de contaminantes en leche cruda proveniente de la cuenca lechera del Tarqui de la Sierra Sur Ecuatoriana. *Maskana*, 8, 121-127.
- Ozdemir, Z., Tras, B., & Uney, K. (2018). Distribution of hydrophilic and lipophilic antibacterial drugs in skim milk, cream, and casein. *Journal of dairy science*, 101(12), 10694-10702.
- Paguay, T., & Coronel, A. (2015). Determinación de la incidencia de adulterantes e inhibidores de leche cruda almacenada en diez centros de acopio de la provincia del Azuay. (Tesis de grado, Cuenca: Universidad de Cuenca).
- Parra Trujillo, M. H., Peláez Suárez, L., Londoño Arango, J. E., Pérez Almario, N., & Rengifo Benítez, G. (2003). Los residuos de medicamentos en la leche. Problemática y estrategias para su control.
- Parra, R. (2009). Lactosuero: Importancia en la Industria de Alimentos. *Revista de la Facultad Nacional Agraria de Medellín*, 62(1), 4967-4982.

- Rama, A., Lucatello, L., Benetti, C., Galina, G., & Bajraktari, D. (2017). Assessment of antibacterial drug residues in milk for consumption in Kosovo. *journal of food and drug analysis*, 25(3), 525-532.
- Ramírez-Cavazos, L., Junghanns, C., Ornelas-Soto, N., Cárdenas-Chávez, D., Hernández-Luna, C., & Demarche, P. et al. (2014). Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 108, 32-42.
- Rodríguez-Delgado, M., Orona-Navar, C., García-Morales, R., Hernandez-Luna, C., Parra, R., Mahlknecht, J., & Ornelas-Soto, N. (2016). Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 34-41.
- Rosado Hoyo, P., & Rosado Hoyo, J. (2013). *Tratamientos previos de la leche*. Antequera, Málaga: IC Editorial.
- Shappell, N. W., Shelver, W. L., Lupton, S. J., Fanaselle, W., Van Doren, J. M., & Hakk, H. (2017). Distribution of animal drugs among curd, whey, and milk protein fractions in spiked skim milk and whey. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(4), 938-949.
- Schewe, R. L., & Brock, C. (2018). Stewarding dairy herd health and antibiotic use on US Amish and Plain Mennonite farms. *Journal of Rural Studies*, 58, 1-11.
- Struch, M., Linke, D., Mokoonlall, A., Hinrichs, J., & Berger, R. G. (2015). Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators. *International Dairy Journal*, 49, 89-94.
- Tempini, P. N., Aly, S. S., Karle, B. M., & Pereira, R. V. (2018). Multidrug residues and antimicrobial resistance patterns in waste milk from dairy farms in Central California. *Journal of dairy science*, 101(9), 8110-8122.
- Trejo-Hernandez, M., Lopez-Munguia, A., & Quintero Ramirez, R. (2001). Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*, 36(7), 635-639.

- Vásquez, J. F., & Olivera, M. (2012). Residuos de  $\beta$ -lactámicos en leche cruda y factores asociados a su presentación. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 157-165.
- Velázquez, B. (2009). *Farmacología Básica y Clínica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Hu, X., Zhou, Q., & Luo, Y. (2010). Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*, 158(9), 2992-2998.
- Ziv, G., & Rasmussen, F. (1975). Distribution of labeled antibiotics in different components of milk following intramammary and intramuscular administrations. *Journal of dairy science*, 58(6), 938-946.
- Zimmermann, J., Binci, A., & Nagel, O. (2012). Efecto de los residuos de antibióticos presentes en suero de leche sobre cultivos agrícolas característicos de Argentina. *7mo Congreso de Medio Ambiente* (págs. 12-14). La Plata: AUGM.

## **ANEXOS**

### **ANEXO A. Fotografías de la experimentación**



**Control de  
temperatura durante  
el pretratamiento**



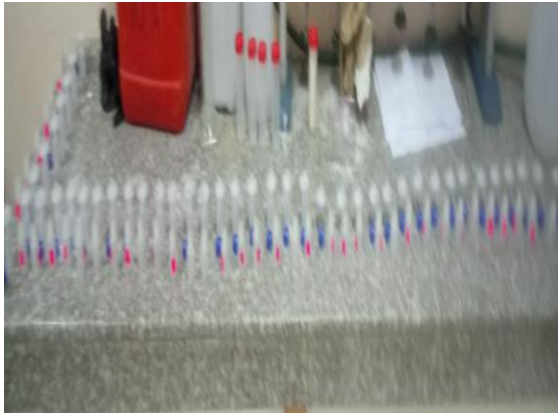
**Suero obtenido por  
centrifugación después de  
acidificar la leche**



**Centrífuga, dónde se  
realizó el fraccionamiento  
de la leche**



**Oxitetraciclina  
extraída con  
acetonitrilo**



**Muestras filtrándose para  
llevar a lectura en el  
cromatógrafo**



**Cromatógrafo Líquido de  
Alta Presión (Perkin Elmer)**



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA EL  
APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN**



**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS**

**REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

**Fecha de entrega:** 07 / 08 /2020

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Jefferson Víctor Paz León
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
Instituto de Posgrado y Educación Continua
<b>Título a optar:</b> Magister en Ingeniería Química Aplicada
<b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b> Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.



07-08-2020

0180-DBRAI-UPT-2020